

***Streptococcus pyogenes:***  
**Biofilmbildung und strukturelle Charakterisierung unter**  
**verschiedenen Wachstums- und Kulturbedingungen.**

**Dissertation**  
zur Erlangung des akademischen Grades  
*doctor rerum naturalium*  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Rostock



vorgelegt von  
**Cordula Lembke**  
aus Rostock

Rostock, Dezember 2009

- 
1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Andreas Podbielski  
Universitätsklinikum Rostock (AöR)  
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene
2. Gutachter: Prof. Dr. Hubert Bahl  
Universität Rostock - Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät  
Institut für Biowissenschaften/Mikrobiologie (IfBi)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 19. Juli 2010

---

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Begriffsdefinition “mikrobielle Biofilme“ .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Entwicklungsphasen von Biofilmen .....</b>	<b>1</b>
1.2.1 Entwicklung und Zusammensetzung .....	1
1.2.2 Die extrazelluläre polymere Biofilmmatrix (EPS).....	4
<b>1.3 Bedeutung der Biofilme .....</b>	<b>5</b>
<b>1.4 <i>S. pyogenes</i> Biofilme .....</b>	<b>7</b>
1.4.1 Taxonomie und Typisierung .....	7
1.4.2 Pathogenese .....	9
1.4.3 Virulenzfaktoren .....	9
1.4.4 Klinische Relevanz von <i>S. pyogenes</i> Biofilmstrukturen .....	11
<b>1.5 Zielstellung.....</b>	<b>12</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>14</b>
2.1.1 Bakterienstämme .....	14
2.1.2 Kultivierung und Stammhaltung .....	15
2.1.3 Nährmedien .....	15
2.1.4 Medienzusätze .....	16
2.1.5 Puffer und Lösungen .....	17
2.1.6 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe .....	18
2.1.7 Chemikalien und Enzyme .....	19
2.1.8 Laborgeräteausstattung .....	21

<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>22</b>
2.2.1 Wachstumsuntersuchungen .....	22
2.2.2 Anzucht von Biofilmen unter statischen Bedingungen (Batchkultur) ....	22
2.2.3 Fluoreszenzmarkierung .....	23
2.2.3.1 Vitalitätsnachweis mittels Lebend/Tot-Färbung .....	23
2.2.3.2 Fluoreszenzfarbstoffe zum Nachweis von EPS-Strukturen .....	24
2.2.4 Laktat-Dehydrogenase (LDH) Aktivitätsmessung .....	25
2.2.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford .....	26
2.2.5 Quantitativer Nachweis der Biofilmbildung mittels Safranin Test .....	27
2.2.6 Mikroskopische Techniken .....	27
2.2.6.1 Fluoreszenzmikroskopie .....	28
2.2.6.2 Konfokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM) .....	28
2.2.6.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....	29
2.2.7 Keimzahlbestimmung von Biofilmen .....	30
2.2.7.1 Gesamtzellzahlbestimmung (GZZ) .....	31
2.2.7.2 Lebendkeimzahlbestimmung (LKZ) .....	31
2.2.8 Untersuchungen zur Biofilmmatrix-Zusammensetzung mit Hilfe von DNase I und Proteinase K .....	32
2.2.9 Untersuchungen zur Biofilmstabilität .....	32
2.2.9.1 Wirksamkeit antimikrobieller Substanzen .....	32
2.2.9.2 Sensitivität gegenüber verschiedenen Lysinen .....	33
2.2.10 Statistische Analysen .....	34
2.2.11 Software .....	34
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Charakterisierung der Biofilmbildung und -struktur.....</b>	<b>35</b>
3.1.1 <i>S. pyogenes</i> Biofilmbildung in Gegenwart verschiedener Kohlenstoffquellen .....	35
3.1.1.1 Quantitative Biofilmuntersuchungen .....	36
3.1.1.2 Morphologische Charakterisierung .....	38
3.1.2 Einfluss verschiedener Faktoren und Kulturbedingungen .....	40
3.1.2.1 Austestung verschiedener Komplex- und Minimalmedien .....	40
3.1.2.2 Einfluss von Saliva und Humanserum .....	44
3.1.2.3 Einfluss von Eisen(III)chlorid .....	48



3.1.2.4	Einfluss der Temperatur.....	51
3.1.2.5	Verfügbarkeit von Sauerstoff.....	53
3.1.3	Die Biofilmbildung verschiedener <i>S. pyogenes</i> Insertionsmutanten.....	54
<b>3.2</b>	<b>Quantifizierung der extrazellulären polymeren Matrix (EPS) ....</b>	<b>59</b>
3.2.1	Wirkung von DNase I und Proteinase K.....	59
3.2.1.1	Biofilmquantifizierung nach DNase I-Behandlung .....	59
3.2.1.2	Biofilmquantifizierung nach Proteinase K-Behandlung .....	62
3.2.2	Mikroskopische Dokumentation .....	64
3.2.3	Visualisierung von EPS-Strukturen .....	69
<b>3.3</b>	<b>Untersuchungen zur Langzeitkultivierung von <i>S. pyogenes</i></b>	
	<b>Biofilmen .....</b>	<b>71</b>
3.3.1	Charakterisierung von Biofilm-Langzeitkulturen (LK) .....	71
3.3.2	Induktion eines VBNC-ähnlichen Status der Biofilmzellen in LK.....	72
3.3.3	Sensitivität von Biofilmzellen in LK gegenüber verschiedenen Lysinen.....	81
3.3.4	Wirkung von Antibiotika auf etablierte Biofilmstrukturen.....	86
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>91</b>
<b>4.1</b>	<b>Der Einfluss verschiedener Parameter auf die Biofilmbildung....</b>	<b>91</b>
4.1.1	Die Rolle des Nährstoffangebotes.....	91
4.1.2	Einfluss verschiedener Mediumzusätze, Temperatur und Sauerstoff.....	95
<b>4.2</b>	<b>Bedeutung von Virulenzfaktoren für die Biofilmbildung.....</b>	<b>98</b>
<b>4.3</b>	<b>Nachweis extrazellulärer Substanzen in der Biofilmmatrix.....</b>	<b>100</b>
<b>4.4</b>	<b>Charakterisierung eines <i>S. pyogenes</i> Biofilm-spezifischen</b>	
	<b>Phänotyps.....</b>	<b>103</b>
4.4.1	pH-Induktion der <i>S. pyogenes</i> Biofilmbildung als Stress-Antwort.....	103
4.4.2	Nachweis eines VBNC-ähnlichen Zustandes von <i>S. pyogenes</i>	
	Biofilmzellen in Langzeitkultur .....	105
4.4.3	Strukturelle Veränderungen von langzeitkultivierten <i>S. pyogenes</i>	
	Biofilmzellen.....	107
<b>4.5</b>	<b>Wirksamkeit ausgewählter Antibiotika.....</b>	<b>108</b>

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>110</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>133</b>
	 Danksagung.....	 138
	Publikationsverzeichnis.....	139

**Abkürzungsverzeichnis**

A	<u>A</u> bsorption
Abb.	<u>A</u> bbildung
AB	<u>A</u> ntibiotika
A. dest	<u>A</u> qua <u>d</u> estillata
AK	<u>A</u> ntikörper
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
BF	<u>B</u> iofilm
BHI	<u>B</u> rain- <u>H</u> eart- <u>I</u> nfusion
BSA	<u>B</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	<u>b</u> eziehung <u>s</u> we <u>s</u> e
°C	Grad Celsius
CcpA	<u>C</u> arbon <u>C</u> atabolit <u>P</u> rotein A
ca.	<u>c</u> irca
ConA	<u>C</u> oncanavalin <u>A</u>
CDM	<u>C</u> hemisch <u>D</u> efiniertes <u>M</u> edium
CLSM	Konfokale Laserscanning Mikroskopie ( <u>C</u> onfocal <u>L</u> asers <u>s</u> canning <u>M</u> icroscopy)
DNA	<u>D</u> esoxyribonukleinsäure
DNase	<u>D</u> esoxyribonuklease
eDNA	<u>e</u> xtrazelluläre <u>D</u> esoxyribonukleinsäure
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetraacetat
<i>E. coli</i>	<u>E</u> scherichia coli
<i>E. faecalis</i>	<u>E</u> nterococcus faecalis
<i>et al.</i>	„et alteri“ (und andere)
EPS	<u>E</u> xtrazelluläre polymere <u>S</u> ubstanz
FITC	<u>F</u> luoreszein- <u>I</u> sothiocyanat
Fn	<u>F</u> ibron <u>e</u> ktin
Frc	<u>F</u> ruktose
GA	<u>G</u> lutardialdehyd
GAS	<u>G</u> ruppe <u>A</u> <u>S</u> treptokokken

---

g	<u>G</u> ramm
Glc	<u>G</u> lu <u>k</u> ose
GZZ	<u>G</u> esamt <u>z</u> ell <u>z</u> ahl
h	Stunde
<i>H. pylori</i>	<u>H</u> elicobacter <u>p</u> ylori
HS	<u>H</u> uman <u>s</u> erum
Ig	<u>I</u> mmunglobulin
IS	<u>I</u> mmun <u>s</u> ystem
k	<u>k</u> ilo
KF	<u>K</u> ammer <u>f</u> aktor
<i>K. pneumoniae</i>	<u>K</u> lebsiella <u>p</u> neumoniae
LB	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani (Broth)
LDH	<u>L</u> aktat- <u>D</u> e <u>h</u> ydrogenase
LK	<u>L</u> angzeit <u>k</u> ultur
LKZ	<u>L</u> ebend <u>k</u> eim <u>z</u> ahl
MW	<u>M</u> ittel <u>w</u> ert
µg	Mikrogramm (10 <sup>-6</sup> )
µl	Mikroliter
Lsg.	<u>L</u> ösung
mg	<u>M</u> illigramm
MHK	<u>M</u> inimale <u>H</u> emm <u>k</u> onzentration
min	<u>M</u> inute
ml	<u>M</u> illiliter
mM	<u>M</u> illimol
Mno	<u>M</u> annose
mod.	<u>m</u> odifiziert
MSCRAMM	“ <u>m</u> icrobial <u>s</u> urface <u>c</u> omponents <u>r</u> ecognizing <u>a</u> dhesive <u>m</u> atrix <u>m</u> olecule”
Mut	<u>M</u> utanolysin
nm	<u>N</u> anometer
OD	<u>O</u> ptische <u>D</u> ichte
PBS	Phosphat- gepufferte Kochsalzlösung („ <u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline“)
<i>P. aeruginosa</i>	<u>P</u> seudomonas <u>a</u> eruginosa
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration

PHA	<u>P</u> hyto <u>h</u> ä <u>m</u> agglutinin
PlyC	<u>P</u> hagen <u>l</u> ysin <u>C</u>
QS	<u>Q</u> uorum <u>s</u> ensing
RALP	„ <u>R</u> of <u>A</u> <u>l</u> ike proteins“
REM	<u>R</u> aste <u>r</u> elektro <u>n</u> en <u>m</u> ikroskopie
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
s.	<u>s</u> iehe
Scr	<u>S</u> ac <u>c</u> harose
SOD	<u>S</u> uper <u>o</u> xid- <u>D</u> ismutase
SOF	<u>S</u> erumopazitätsfaktor
<i>S. pyogenes</i>	<u>S</u> treptococcus <u>p</u> yogenes
<i>S. aureus</i>	<u>S</u> tapyhlococcus <u>a</u> ureus
<i>S. epidermidis</i>	<u>S</u> taphylococcus <u>e</u> pidermidis
Tab.	<u>T</u> abelle
TE	<u>T</u> ris- <u>E</u> DTA
Tris	<u>T</u> ri <u>s</u> hydroxymethylaminoethan
U	<u>U</u> nit
u. a.	<u>u</u> nter <u>a</u> nderem
ü. N.	<u>ü</u> ber <u>N</u> acht
Upm	<u>U</u> mdrehungen pro <u>M</u> inute
UV	<u>U</u> ltraviolett
ÜNK	<u>Ü</u> ber- <u>N</u> acht- <u>K</u> ultur
VBNC	„ <u>v</u> iable <u>b</u> ut <u>n</u> on <u>c</u> ulturable“
VF	<u>V</u> erdünnungs <u>f</u> aktor
v/v	<u>V</u> olumen pro <u>V</u> olumen
Vol.	<u>V</u> olumen
<i>V. vulnificus</i>	<u>V</u> ibrio <u>v</u> ulnificus
WGA	<u>W</u> heat <u>G</u> erm <u>A</u> gglutinin
WT	<u>W</u> ild <u>t</u> yp
w/v	Masse („ <u>w</u> eight“) pro <u>V</u> olumen
z. B.	<u>z</u> um <u>B</u> eispiel

# **1 Einleitung**

## **1.1 Begriffsdefinition “mikrobielle Biofilme“**

Die Definition des Begriffs Biofilm entwickelte sich über einen Zeitraum von über 25 Jahren (42). Zunächst wurde die Hypothese formuliert, dass Bakterien in aquatischen Ökosystemen adhärent auf Oberflächen wachsen können und dabei in einer „Glykokalyx-Matrix“ als Biofilm umschlossen sind. Später konnte durch zahlreiche Forschungsergebnisse gezeigt werden, dass die Entwicklung von Biofilmen mit der Anheftung von Einzelzellen bzw. Mikrokolonien beginnt und diese im weiteren Verlauf der Entwicklung durch eine extrazelluläre Polymermatrix (EPS) bakteriellen Ursprungs eingebettet werden.

Mehr als 99 % aller Bakterien wachsen in Biofilmstrukturen und sind durch ein ubiquitäres Vorkommen gekennzeichnet. Je nach Vorkommen können sich Biofilme aus Bakterien, Pilzen und Protozoen zusammensetzen (45, 47, 58). Dabei wird zwischen verschiedenen Formen von Biofilmen unterschieden. Neben den adhärent wachsenden mikrobiellen Biofilmaggregaten an Oberflächen und Grenzflächen gibt es noch die sogenannten Flocken (schwimmende Biofilme) sowie große Ansammlungen von Biomasse (Schwämme).

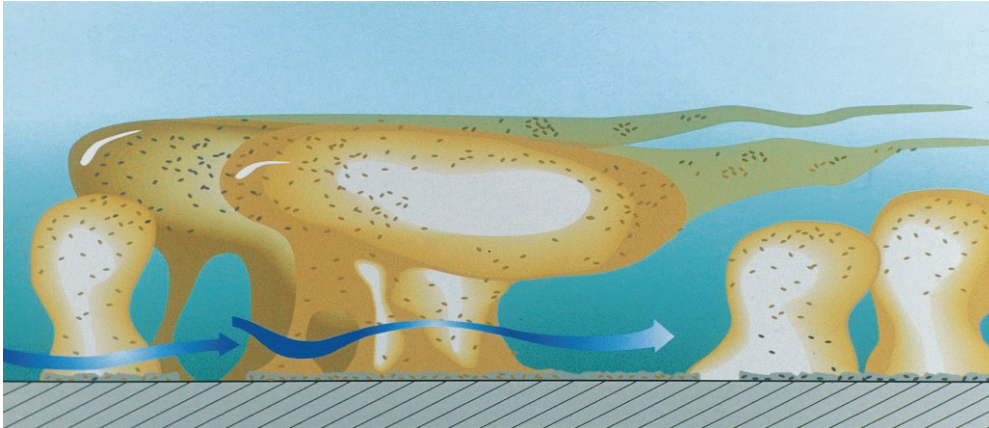
Die Adhäsion an Oberflächen, die anschließende Reifung dieser Biofilmstrukturen sowie die Verteilung der Bakterien im Biofilm ist durch Veränderungen der Genexpressionen, Wachstumsraten sowie des bakteriellen Metabolismus gekennzeichnet (47).

## **1.2 Entwicklungsphasen von Biofilmen**

### **1.2.1 Entwicklung und Zusammensetzung**

Biofilme stellen strukturell gesehen heterogene Systeme dar, da sie sowohl aus einer einzigen Bakterienart (Monospezies-Biofilm) als auch aus einer Vielzahl verschiedener Bakterienarten (Multispezies-Biofilm) bestehen können (58, 249). Mit Hilfe neuer Untersuchungstechniken, wie der Mikroskopie (Rasterelektronenmikroskopie [REM], Konfokale Laserscanning Mikroskopie [CLSM]) in Kombination mit verschiedenen mikro- und molekularbiologischen Methoden sowie der Erstellung mathematisch berechneter Simulationsmodelle konnten repräsentative Erkenntnisse über Entwicklung, Struktur und Interaktionen von Biofilmen gewonnen werden.

So weisen reife Biofilme makromorphologisch betrachtet häufig pilz- oder tulpenförmige Strukturen auf. In diesen sind die Bakterien in die EPS-Matrix eingebettet. In allen Schichten innerhalb des Biofilms befinden sich Kanäle für den Transport von Nährstoffen bzw. für den Abtransport verbrauchter Stoffwechselprodukte (Abb. 1). Die gesamte Struktur der Biofilme wird von vielen Faktoren wie dem Nährstoffangebot, den Strömungsbedingungen, der Oberflächenstrukturen und vor allem von den im Biofilm enthaltenen Bakterienspezies beeinflusst (45, 60).



**Abb. 1:** Modellldarstellung eines Biofilms (58)

Trotz vorhandener struktureller Unterschiede verläuft die Entstehung eines bakteriellen Biofilms nach einem allgemeinen, weithin akzeptierten Schema (Abb. 2), deren Entwicklungsstufen an die Phasen einer klassischen Wachstumskurve für planktonische, d. h. freibewegliche Bakterien, angelehnt werden können. (57, 243).

1. **Initiale Bindung** von planktonischen Bakterienzellen an die Oberfläche (Erstkolonisierer). Diese Anlagerung erfolgt über spezifische Wechselwirkungen und wird je nach Bakterienspezies über unterschiedliche Faktoren gesteuert.

Bei Gram-positiven Bakterien der Gattungen *Staphylococcus* und *Streptococcus* werden adhäsive Oberflächenkomponenten (Adhäsine) gebildet, die u. a. für eine stabile Anheftung auf der Oberfläche verantwortlich sind (122, 149).

2. **Proliferation** und **Reifung** der sessilen Bakterienzellen sowie die Entstehung von Mikrokolonien (= Mikrokonsortien), in vergleichbarer Annäherung mit der logarithmischen Wachstumsphase.

Dieser Prozess umfasst den Beginn der Produktion von extrazellulären Matrixkomponenten, in denen die Zellen zur Stabilisierung der noch unreifen Biofilmstruktur eingebettet werden. Die Reifung des Biofilms beginnt mit einer

starken Zunahme an Biofilmmasse durch Bildung von Matrixmaterial sowie einer Ko-Aggregation mit neuen Zellen. Grundlage dafür ist zum einen die Zell-Zell-Erkennung, zum anderen die Bindung an EPS-Komponenten über spezifische Faktoren. Dadurch können neue Bakterienzellen (Zweitkolonisierer) an die bereits vorhandenen Erstkolonisierer und deren Matrix binden (Ko-Adhäsion). Die Phänomene der Ko-Aggregation und Ko-Adhäsion während der Biofilmbildung wurden für orale Streptokokken ausgiebig beschrieben (81, 122).

Während des Reifeprozesses herrschen optimale Bedingungen für die Entwicklung der „genetischen Kompetenz“, der Kommunikation über Quorum sensing (QS), der Expression Biofilm-spezifischer Gene sowie der Produktion von Matrixproteinen, die zum Aufbau und zur Stabilität des reifen Biofilms führen (58, 124, 243). Der nun erreichte Zustand ist vergleichbar mit der stationären Phase, in der die Zellzahl relativ konstant bleibt und sich ein Gleichgewicht zwischen Zellwachstum und Zellfreisetzung einstellt (74).

3. **Die Freisetzung („Detachment“)** und Streuung von einzelnen Bakterienzellen, sogenannten Schwärmer- oder Tochterzellen, gehört zur letzten Phase der Biofilmentwicklung.

Der reife Biofilm unterliegt einem ständigen strukturellen Wandel und gilt deshalb als dynamisches System. Dieser Prozess unterliegt sowohl biophysikalischen, genetischen als auch kommunikativen Regulationsmechanismen (57, 140, 216, 220).

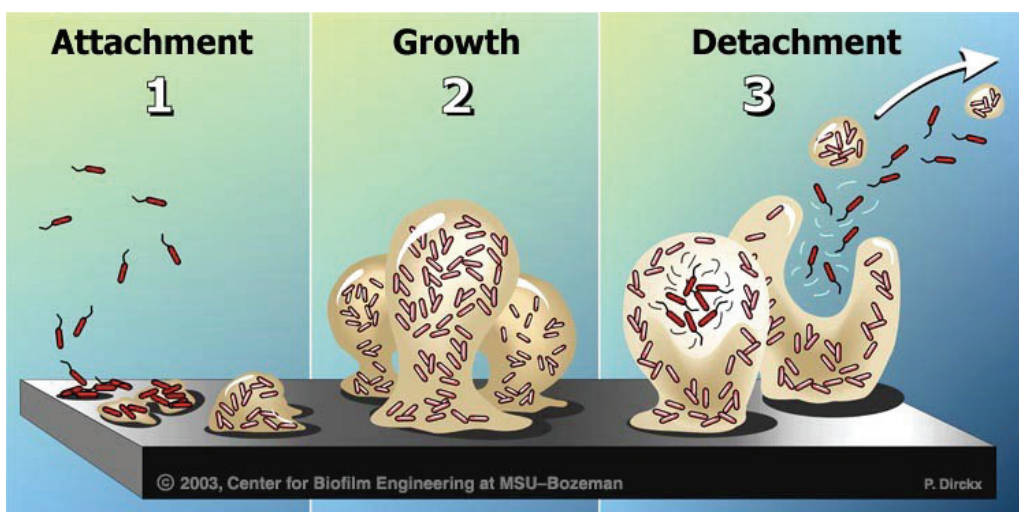


Abb. 2: Entwicklungsstufen der Biofilmbildung (Montana State University, Bozeman)



### **1.2.2 Die extrazelluläre polymere Biofilmmatrix (EPS)**

Ein wichtiger Bestandteil bakterieller Biofilme wird von den Zellen selbst produziert, die Biofilmmatrix. Diese extrazelluläre polymere Substanz (EPS) füllt und formt den Raum zwischen den Zellen. Häufig beschriebene Schlüsselkomponenten der EPS sind verschiedene Biopolymere wie Polysaccharide, Glykoproteine, Proteine, verschiedene Lipide und Nukleinsäuren. Der größte Anteil der EPS enthält Wasser (1, 45, 76). Eine besondere Bedeutung kommt dem Anteil an Nukleinsäuren zu. Die extrazelluläre DNA (eDNA) scheint eine essentielle Rolle in der Biofilmstabilität, Zell-Kommunikation sowie als interzelluläres Verbindungsmolekül zwischen den Biofilmzellen zu übernehmen (76, 178, 217, 247).

Die EPS-Matrix prägt in entscheidender Weise die Eigenschaften des Biofilms und kann somit als verantwortlich für die Stabilität und Funktionalität angesehen werden. Des Weiteren wirkt die EPS als Diffusionsbarriere, molekulares Netz für Ionenaustausche, als Sorbens oder auch als Reservoir akkumulierter Nährstoffe oder Enzyme, wobei letztere einen Abwehrmechanismus gegen antimikrobielle Substanzen darstellen können (9, 75, 76, 87, 223, 239).

Eine weitere, aber weniger stark untersuchte EPS-Komponente stellen Membranvesikel dar, die während der Entstehung von Zellmembranen abgeschnürt werden und Interaktionen mit der DNA eingehen können (203, 204).

Aufgrund des engen räumlichen Zusammenhalts der Biofilmzellen durch die Matrix können diese untereinander mit sezernierten spezifischen Signalmolekülen kommunizieren. Diese Zell-zu-Zell-Kommunikation hat eine entscheidende Bedeutung für die Biofilmbildung und Biofilmreifung. Es kann auch zum Austausch von genetischen Elementen innerhalb einer Biofilmgemeinschaft kommen, wodurch oftmals auch Antibiotikaresistenzen übertragen werden können (58, 140, 216, 220, 222).

Die Biofilmstruktur ist außerdem von den Umgebungsbedingungen abhängig. Exogene Faktoren wie Scherkräfte, Temperatur, Nährstoffe, Sauerstoff oder die Limitierung der Verfügbarkeit von Metallionen können die Zusammensetzung der EPS und des Biofilms beeinflussen (22, 47, 61, 148, 236).

Die Strömung von wässrigen Lösungen durch die Poren gewährleisten einen effektiven Transport aller Nährstoffe und von Sauerstoff sowie einen Abtransport von Stoffwechselendprodukten aus den tieferen Schichten des Biofilms (60, 219).

Aufgrund der hohen Dichte an Zellen in der EPS können Nährstoffe und Sauerstoff durch eine begrenzte Diffusion nicht mehr in die tieferen Schichten gelangen. Dadurch kann sich ein chemischer Gradient sowie ein differentes Mikromilieu bis hin zur kompletten Anaerobiose auch in sauerstoffhaltiger Umgebung ausbilden (18, 45, 238).

### **1.3 Bedeutung der Biofilme**

Biofilme kommen in der Natur ubiquitär vor und sind durch eine hohe Variabilität und Heterogenität hinsichtlich der Bakterienspezies, Zellverteilung sowie der Nährstoffanforderungen gekennzeichnet. Die in einem Biofilm lebenden Bakterien zeigen im Vergleich zu ihrer planktonischen Lebensform ein außerordentliches Anpassungsvermögen gegenüber verschiedenen Umweltfaktoren wie pH, Temperatur, UV-Bestrahlung, Zelldichte oder antimikrobiellen Substanzen (45, 47, 57, 96).

Die am intensivsten untersuchten Biofilme stammen, neben dem industriellen und technischen Bereich („Biofouling“ und Biodetoration), aus dem Bereich der Medizin bzw. der medizinischen Mikrobiologie. In diesem Sektor sind solche Strukturen meist unerwünscht, da sie häufig mit schweren chronischen Infektionen und erhöhten Antibiotikaresistenzen in Verbindung gebracht werden.

Typische Biofilm-assoziierte Infektionen verlaufen in der Regel chronisch-rezidivierend. Dazu gehören z. B. Gingivitis und Parodontitis, Prostatitis, Endokarditis, respiratorische Infektionen bei der Zystischen Fibrose oder Fremdkörper-assoziierte Infektionen, welche ein sehr großes Problem der chirurgischen Medizin darstellen (23, 47, 68, 87, 95, 122, 152, 248). In solchen Fällen kann der Biofilm eine dauerhafte Ausgangsquelle für systemische Infektionen darstellen, da von dort aus Bakterienzellen als Schwärmerzellen in andere Bereiche des Wirtes vordringen und neue Biofilme bilden können.

Die Persistenz der Biofilme im menschlichen Wirt erklärt sich damit, dass die im Biofilm lebenden Bakterien nicht nur gesteigerte Resistenzen gegenüber der Wirtsabwehr (Antikörper), sondern auch gegen Desinfektionsmittel und sogar einige Sterilisationsprozesse aufweisen (107, 173, 237).

Demgegenüber sind pathogene Mikroorganismen, die nicht im Biofilm leben, typischerweise gegenüber Antibiotika empfindlicher und werden somit von diesen schneller abgetötet (31, 45, 47).

Biofilm-typische, von planktonischen Bakterien nicht gezeigte Resistenzmechanismen sind u. a. eine verringerte Penetration von Antibiotika aufgrund der kompakten EPS-Strukturen, die dauerhafte Bindung von Antibiotika an die EPS und veränderte Transmembrantransportprozesse bei geringem Sauerstoffpartialdruck im Biofilm (68, 87).

Während der anhaltenden Biofilmmreifung können Biofilmzellen in einen stationäre-Phase-ähnlichen Zustand wechseln, wodurch es ebenfalls zu einer geringen Sensitivität gegenüber externen Stressfaktoren wie Antibiotika kommt (8, 18, 87, 214, 240).

Zusätzlich zum passiven Schutz gegenüber antimikrobiell wirksamen Substanzen durch Verringerung der metabolischen Aktivität und Verlust der Zellvermehrung, können sich Bakterien auch aktiv an Stress anpassen. Dementsprechend sind viele Stress-Antworten als Reaktion darauf nachweisbar (30, 87, 99, 201, 253).

Hält diese stationäre Biofilmphysiologie über einen längeren Zeitraum an, kann es zu einem Verlust der Kultivierbarkeit der Zellen kommen, wobei sie aber sowohl strukturell intakt als auch in geringem Maße metabolisch aktiv bleiben. Dieser Zustand wird auch als „*viable but non culturable*“ (VBNC) bezeichnet.

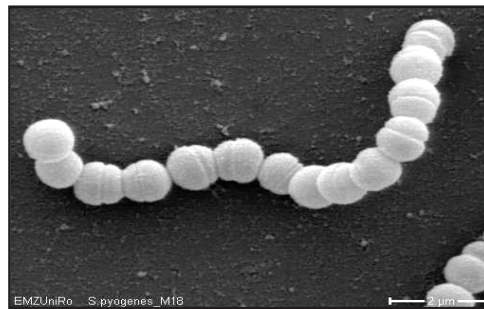
Für viele Pathogene ist dieser Überdauerungszustand sowohl eine Form der Überlebensstrategie als auch ein Teil der Virulenzstrategie. Selbst wenn der Nachweis der VBNC-Bakterien gelingt, versagen wegen der geschilderten Unempfindlichkeit der Bakterien in aller Regel jegliche Antibiotikatherapien (3, 99, 143, 208). Dieser Zustand stellt die medizinische Routinediagnostik vor große Probleme, da eine Vielzahl von Biofilm-assoziierten Infektionserregern nicht identifiziert und entsprechend behandelt werden können (87).

## 1.4 *S. pyogenes* Biofilme

### 1.4.1 Taxonomie und Typisierung

*S. pyogenes* ist ein wichtiger Gram-positiver und ausschließlich humanpathogener Erreger, der paarweise oder in Ketten angeordnet vorliegt. Dieses Bakterium ist unbeweglich, wächst fakultativ anaerob und bildet weder Katalase noch Dauerformen (= Sporen) aus.

Aufgrund seiner Fähigkeit, Kohlenhydrate primär durch fermentative Milchsäuregärung in Laktat umzuwandeln, wird es taxonomisch der Ordnung der Milchsäurebakterien (*Lactobacillales*) zugeordnet. Innerhalb der Ordnung wird es zur Familie der *Streptococcaceae* und zur Gattung *Streptococcus* gezählt. Wie andere Streptokokken zeigt *S. pyogenes* ein auxotrophes Verhalten für bestimmte Aminosäuren und Wachstumsfaktoren.



**Abb. 3:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme vom *S. pyogenes* Serotyp M18-Stamm (10000-fach, eigene Aufnahme)

Ein charakteristisches Merkmal zur Klassifizierung von Streptokokken liegt in der Eigenschaft ihres Hämolyseverhaltens. Demnach differenziert man bei Wachstum auf Blutagar drei verschiedene Hämolysearten (29).

- (I) Die  $\alpha$ -Hämolyse wird als unvollständige Hämolyse bezeichnet und ist durch grünlich verfärbte Höfe um die Bakterienzellen herum gekennzeichnet. Diese „Vergrünung“ ist auf eine Oxidation des im Blutagar vorliegenden Hämoglobins zu Methämoglobin durch von den Bakterien sezernierte Substanzen wie Wasserstoffperoxid zurückzuführen.
- (II) Die  $\beta$ -hämolisierenden Streptokokken zeigen eine vollständige Hämolyse. Hierbei werden die Erythrozyten im Blutagar lysiert und das freiwerdende Hämoglobin abgebaut, wodurch es zur Ausbildung einer klaren Hämolysezone um die Kolonien herum kommt.
- (III) Die  $\gamma$ -hämolisierenden Streptokokken besitzen keine hämolytische Aktivität.

Die in dieser Arbeit untersuchten *S. pyogenes* Stämme gehören zu den  $\beta$ -hämolyisierenden Streptokokken. Die serologische Differenzierung der  $\beta$ -hämolyisierenden Streptokokken durch Rebecca Lancefield (133) in die Gruppen „A“ bis „V“ basiert auf der Präsenz verschiedener Polysaccharid-Antigene in der Zellwand. *S. pyogenes* wurde der Gruppe „A“ zugeordnet und wird daher synonym auch als Gruppe A Streptokokken (GAS) bezeichnet.

Weitere Möglichkeiten der Typisierung von *S. pyogenes* bestehen durch serologische Reaktionen mit dem Serumopazitätsfaktor (SOF), dem M- und dem T-Protein (114). Diese Eigenschaften sind insbesondere für epidemiologische Differenzierungen von großer Bedeutung. Die Expression des SOF erlaubt eine Einteilung in SOF-positive und SOF-negative Isolate (232). SOF ist eine Apolipoproteinase, welche die Freisetzung von Fettsäuren aus Fetttransport-Komponenten in verschiedenen Säugetierseren und in der Folge die Ausfällung von unlöslichen Fettsäuresalzen bewirkt (199, 200, 126).

Eine weitere von R. Lancefield eingeführte Typisierung erfolgt anhand des M-Proteins. Hierbei handelt es sich um ein wichtiges Zellwandprotein, dass von allen *S. pyogenes* Stämmen exprimiert wird und aufgrund seiner antiphagozytären Wirkung zu den wichtigen Virulenzfaktoren gehört (129, 134). Die Typisierung basiert auf dem spezifischen Nachweis hypervariabler Sequenzabschnitte im N-terminalen Bereich des M-Proteins. Diese Methode erlaubt eine serologische Differenzierung von bisher mindestens 80 Serotyp-Klassen (133). Bei etwa der Hälfte aller Isolate ist die Immunogenität des M-Proteins für eine sichere serologische M-Typisierung zu gering. Deshalb werden zusätzlich molekularbiologische Methoden wie die Sequenzierung des M-Protein-kodierenden *emm*-Gens oder *emm*-Typ-spezifische PCRs eingesetzt (11, 183, 184). Auf diese Weise lassen sich etwa 150 verschiedene GAS *emm*-Typen unterscheiden.

Neben der M-Typisierung besteht zusätzlich die Möglichkeit der serologischen Differenzierung anhand des T-Antigens. Es ist, wie das M-Protein, ein Zellwandprotein, das in mehr als 25 Varianten vorkommt. Dessen physiologische Bedeutung wurde im Jahr 2005 durch Mora *et al.* (158) beschrieben. Demnach sind T-Antigene Pilus-Proteine. Jeder T-Typ kann mit mehreren M-Typen assoziiert sein (161).

### 1.4.2 Pathogenese

*S. pyogenes* ist ein ausschließlich humanpathogenes Bakterium, das bei einem geringen Prozentsatz an Menschen, sog. Trägern, zur Normalflora des Nasen-Rachenraumes gehören kann (169). Für das Auslösen von Krankheiten nutzt dieser Erreger sezernierte und oberflächenlokalisierte Virulenzfaktoren, von denen eine Vielzahl intensiv erforscht und charakterisiert ist (56). Die Infektionen können mild (Pharyngitis, Tonsillitis oder Impetigo) oder in seltenen Fällen als systemisch invasive Infektionen verlaufen (Streptokokken-Toxisch-Schock-Syndrom [STSS], nekrotisierende Fasciitis).

Des Weiteren kann es zu einer asymptomatischen Besiedlung mit *S. pyogenes* in den Phasen zwischen rezidivierenden lokalen oder systemischen Infektionen kommen (27, 54, 180, 188, 189). Diese asymptomatische Besiedlung wird auf die Fähigkeit von *S. pyogenes* zurückgeführt, spezifisch an eukaryote Wirtszellen zu adhären, in diese zu internalisieren und dort für einen längeren Zeitraum zu überdauern. Innerhalb der Wirtszelle kann *S. pyogenes* im nicht-aktivierten Phagolysosom oder im Zytoplasma über einen längeren Zeitraum überleben, ohne die Wirtszelle selbst durch die Produktion von bakteriellen Toxinen zu zerstören (51, 129, 156, 188, 241).

In diesem Zustand sind die Bakterien vor Angriffen des Immunsystems geschützt und können über mehrere Tage, Wochen oder auch Monate ohne Einschränkung ihrer Vitalität persistieren und unter bestimmten Voraussetzungen die wiederkehrenden Infektionen hervorrufen. Diese intrazelluläre Lokalisation gilt als eine Erklärung für das Versagen von  $\beta$ -Laktamtherapien, da in den Wirtszellen keine bakteriziden Konzentrationen der ansonsten durch die erste Wahl darstellenden Medikamente erreicht werden können (40, 208).

### 1.4.3 Virulenzfaktoren

Eine notwendige Voraussetzung für den Infektionsprozess ist eine erfolgreiche Kolonisation des initialen Zielgewebes. Spezifische bakterielle Proteine, die unter dem Begriff Adhäsine zusammengefasst werden, vermitteln dabei die Adhärenz der Bakterien an die eukaryoten Zellen. Die Expression solcher *S. pyogenes*-Adhäsine sowie ihre Regulation wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst und ist mittlerweile gut untersucht (51, 128).

Aufgrund struktureller und funktioneller Ähnlichkeiten werden die meisten *S. pyogenes* Oberflächenproteine einer gemeinsamen Proteinfamilie, den MSCRAMMs („microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“) zugeordnet. Diese binden

wirtseigene Matrixproteine, wie z. B. Fibronectin, Fibrinogen, Kollagen, Laminin sowie Heparin-ähnliche Proteine (175, 176).

Zur Klasse der Fibronectin-bindenden MSCRAMMs gehören die beiden homologen Proteine Protein F (98, 207) und SfbI (229, 230), das Protein F2 (111, 128) sowie der Serumopazitätsfaktor SOF (50, 126, 168). Ein Vertreter der Kollagen-bindenden MSCRAMM-Familie ist das Kollagen TypI-bindende Protein Cpa („*collagen-binding protein of group A streptococci*“) (187, 130). Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von Pili-Strukturen eine erhöhte Adhärenz- und Kolonisierungsrate an bzw. in pharyngeale Wirtszellen als auch die *in vitro* Biofilmbildung von *S. pyogenes* induziert (149). Eine detaillierte Beschreibung der Funktionsweise der hier genannten Proteine im Rahmen der Wirtszelladhärenz und -internalisierung findet sich bei Kreikemeyer *et al.* (128).

Von großer Bedeutung als Virulenzfaktoren sind zudem auch extrazelluläre Proteasen (Aggressine, Toxine), wie z. B. Streptolysin O (SLO, sauerstofflabil) und S [SLS, sauerstoffstabil (24, 80, 145)], die Streptokinase Ska und die Cysteinprotease SpeB (*S. pyogenes* Exotoxin B). Über den Sec-Sekretionsweg sezerniert, ist SpeB nach der Reifung als aktive Protease an vielen Pathogenitätsmechanismen wie der Wirtszelladhärenz und -internalisierung sowie Toxizität und Apoptose beteiligt (196). Als Virulenzfaktor kann es eine wichtige Rolle für die Biofilmbildung spielen. So konnte in Versuchen gezeigt werden, dass SpeB die Biofilmbildung negativ beeinflusst und ein erst kürzlich beschriebener Negativregulator (Srv) der SpeB-Expression die Biofilmasseproduktion fördert (67, 146).

Zudem zeigte sich, dass die Dipeptidpermease (Dpp) als membranassoziiertes ABC-Transporter die Expression von SpeB reguliert. Der Proteinkomplex, bestehend aus fünf Genen (*dppA-dppE*), ist an Interaktionen zwischen der Aminosäureaufnahme und der Virulenzgen-Expression beteiligt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass SpeB die Kapselsynthese (*has*-Gen) bei *S. pyogenes* negativ beeinflussen kann. Demnach ist die Aktivität des *has*-Gens ein wichtiger Virulenzfaktor und essentiell für die Fähigkeit der Biofilmbildung von *S. pyogenes* (33, 186, 202, 242).

Eine koordinierte Regulation der Virulenzfaktoren ist für die Pathogenese von *S. pyogenes*, insbesondere für die Wirt-Pathogen-Interaktionen, von entscheidender Bedeutung. Diese erfolgt durch einzelständige Transkriptionsregulatoren (stand-alone-Regulatoren, SAR) sowie über Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssysteme (127, 129, 160, 172, 212).

Dazu gehören der globale Positivregulator Mga („*multiple gene regulator of GAS*“) und RofA („*regulator of fibronectin binding protein*“), die mit weiteren Virulenzgenen in distinkten genomischen Regionen organisiert sind.



Über Mga wird eine Vielzahl von Genen reguliert, die in den Zuckerstoffwechsel und andere metabolische Prozesse von *S. pyogenes* involviert sind (105, 116, 209). Die Expression von Mga ist autoreguliert und essentiell wichtig für die bakterielle Autoaggregation und Bildung von Biofilm-ähnlichen Strukturen (146, 149, 192).

Neben Mga gibt es noch den RofA Regulator, der einen Positivregulator darstellt, Serotyp-spezifisch in der FCT-Region (fibronectin-/collagen-binding, T-Antigen-region, genomische Region mit einer großen Anzahl Virulenzfaktor-kodierenden Genen des *S. pyogenes* Genoms) lokalisiert und u. a. in die bakterielle Zelladhärenz involviert ist. Diese wiederum hat eine entscheidende Bedeutung für die Ausbildung von Biofilmen (15, 16, 129, 187).

Beide Regulatoren übernehmen essentielle Funktionen des bakteriellen Regulationsapparates für die Virulenz, des Metabolismus und der Überlebensfähigkeit des pathogenen Keimes *S. pyogenes*.

#### **1.4.4 Klinische Relevanz von *S. pyogenes* Biofilmstrukturen**

Das primäre Ziel der Besiedlung für *S. pyogenes* auf seinem menschlichen Wirt sind die Epithelzellen der Haut und Schleimhäute. Einige Details der Interaktionen zwischen den Bakterien und den eukaryoten Zellen sind bereits bekannt (54). Allerdings ist bisher unklar, wie *S. pyogenes* mit den Mikroorganismen interagiert, die einen natürlichen Biofilm als physiologische Barriere auf der Oberfläche der menschlichen Epithelienzellen bilden. Unter definierten *in vitro* Bedingungen wurde nachgewiesen, dass verschiedene *S. pyogenes* Stämme zur Biofilmbildung auf abiotischen Oberflächen befähigt sind (136).

Einen ersten Zusammenhang zwischen exprimierten Oberflächenmolekülen und der anschließenden Bildung von Mikrokolonien zeigten die Untersuchungen von Hirota *et al.* (102) sowie die Arbeitsgruppe um Frick *et al.* auf (84). In diesen Studien wurde auch erstmalig *S. pyogenes* in einem Kontext mit der möglichen Biofilmbildung erwähnt. Biofilm-ähnliche Strukturen von *S. pyogenes* wurden in infizierten Hautarealen beschrieben (2). In klinischen Isolaten aus der Zahnwurzel wurde zudem dieser Erreger als Mitglied von Mehrspezies-Biofilmen u. a. mit *S. intermedius* und *E. faecalis* identifiziert (1, 228).

Diese Daten suggerieren, dass die Erforschung von *S. pyogenes* Biofilmstrukturen, der Zusammensetzung sowie ihrer klinischen Bedeutung von großem Interesse ist.



## 1.5 Zielstellung

Die *in vitro* Bedingungen für eine optimale *S. pyogenes* Biofilmbildung sind gut charakterisiert. Ebenso wurden die dafür notwendigen Voraussetzungen zur initialen Bindung des Erregers an Oberflächen identifiziert. Die detaillierte Analyse der zur Biofilmbildung notwendigen physiologischen Bedingungen sowie eine morphologische und funktionale Charakterisierung der Biofilme von drei verschiedenen *S. pyogenes* Stämmen der Serotypen M2, M6 sowie M18 unter dem Einfluss verschiedener Faktoren ist bisher nicht erfolgt. Folgende Zielsetzung lagen daher der vorliegenden Arbeit zugrunde:

- I. Zum einen sollte untersucht werden, unter welchen physiologischen Bedingungen und in welchem Ausmaß die *S. pyogenes* Biofilmbildung beeinflusst wird. Dazu sollten Umgebungsfaktoren wie Temperatur, Eisenkonzentration und Sauerstoffverfügbarkeit untersucht werden.  
Weiterhin standen Analysen über die Verwertbarkeit von verschiedenen C-Quellen sowie die Wirkung von Speichel und Serum auf die Biofilmbildung im Fokus dieser Untersuchungen. Unter Zuhilfenahme von kulturbasierenden und mikroskopischen Nachweismethoden sollte sowohl die Entwicklung als auch die morphologische Veränderung der Biofilmformation dokumentiert werden.
- II. Mit dieser Arbeit sollte außerdem die Frage beantwortet werden, aus welchen Komponenten sich die extrazelluläre Biofilmmatrix zusammensetzt. Für viele andere pathogene Spezies wurden bereits Methoden für die EPS-Charakterisierung beschrieben, die nun in der vorliegenden Arbeit angewendet werden (79, 178, 205). Weil noch keine Erkenntnisse über mögliche Strukturkomponenten der *S. pyogenes* Matrix vorlagen, sollte der Fokus hauptsächlich auf dem Nachweis von Nukleinsäuren sowie anderen polymeren, zuckerhaltigen Strukturen liegen.
- III. Daran anschließen sollten sich Untersuchungen zu der Frage, welcher Bezug zwischen etablierten Virulenzmechanismen von *S. pyogenes* und der Biofilm- bzw. Mikrokolonienbildung besteht. Dazu wurde mit ausgewählten Insertionsmutanten gearbeitet.

- IV. Für *S. pyogenes* als pathogenen Erreger konnte gezeigt werden, dass er im Zellgewebe über einen längeren Zeitraum persistieren kann (188). Dabei ist unklar, ob diese Besiedlung in Form von Biofilm-ähnlichen Strukturen erfolgt oder welche metabolischen und strukturellen Veränderungen in den Bakterienzellen mit dieser asymptomatischen Besiedlung verbunden sind.
- Hier sollte die Frage geklärt werden, welche Veränderungen in Langzeitkulturen auftreten. Dafür sollten die Biofilmzellen mittels mikrobiologischer Nachweisverfahren wie Lebend- und Gesamtzellzahlbestimmung sowie fluoreszenzmikroskopischer Dokumentation charakterisiert werden. Als metabolischer Parameter sollte die Bestimmung der Laktat-Dehydrogenase erfolgen und die strukturellen Veränderungen von *S. pyogenes* Biofilmzellen mit Hilfe von Lysinen definiert werden.
- V. Aus medizinischer Sicht stellt die Bildung von Biofilmen das Hauptproblem von Therapieversagen und wiederkehrenden Infektionen dar. Daher wurde das Resistenzverhalten von Biofilmen gegenüber verschiedenen Antibiotika untersucht, die auch therapeutisch bei *S. pyogenes* Infektionen eingesetzt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienstämme

In der folgenden Tabelle 1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme aufgelistet. Die ausgewiesenen Referenzen beziehen sich auf die Stammsammlung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock.

**Tab. 1** : Bakterien

Bakterienstamm	Merkmale	Herkunft / Referenz
<i>S. pyogenes</i> M2	Stamm Nr. 613, Hautisolat	R. Lütticken, Aachen, Deutschland
<i>S. pyogenes</i> M6	Stamm Nr. 616, Tonsillitisisolat	Podbielski <i>et al.</i> , 1991
<i>S. pyogenes</i> M18	Stamm Nr. 3805, Patientenisolat	Hamilton, USA
<i>S. pyogenes</i> M2 <i>emm</i> <sup>-</sup>	ermm::aad <sup>9</sup>	Stammsammlung, Universität Rostock
<i>S. pyogenes</i> M2 <i>ska</i> <sup>-</sup>	ska:: aad <sup>9</sup>	Stammsammlung, Universität Rostock
<i>S. pyogenes</i> M2 <i>speB</i> <sup>-</sup>	speB:: aad <sup>9</sup>	Stammsammlung, Universität Rostock
<i>S. pyogenes</i> M2 <i>dpp</i> <sup>-</sup>	dpp::aad <sup>9</sup>	Stammsammlung, Universität Rostock
<i>S. pyogenes</i> M2 <i>hasA</i> <sup>-</sup>	hasA::aad <sup>9</sup>	Stammsammlung, Universität Rostock
<i>S. pyogenes</i> M2 <i>rofA</i> <sup>-</sup>	rofA::aad <sup>9</sup>	Stammsammlung, Universität Rostock
<i>S. pyogenes</i> M2 <i>mga</i> <sup>-</sup>	mga:: aad <sup>9</sup>	Stammsammlung, Universität Rostock

### 2.1.2 Kultivierung und Stammhaltung

Für die Kultivierung wurde *S. pyogenes* auf Blutagarplatten (Columbia Agar mit 5 % Schafsblut, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) gezüchtet und für maximal eine Woche bei 4 °C gelagert. Mit einer sterilen Impföse erfolgte das Beimpfen von flüssigen Über-Nacht-Kulturen (ÜNK) in Brain-Heart-Infusion Medium (BHI) mit 0,5 % Glucose [w/v].

Zur längerfristigen Aufbewahrung der Bakterien wurde das Microbank™ System (Pro-Lab Diagnostics, Neston, England) genutzt und die Stämme bei -80 °C gelagert.

Die selektive Anzucht rekombinanter *S. pyogenes* Stämme erfolgte unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums (Tab. 2) zu den entsprechenden Kulturen.

### 2.1.3 Nährmedien

Alle Nährmedien, ausgenommen das chemisch definierte Medium (CDM), wurden direkt nach der Herstellung bei 121 °C für 20 min sterilisiert. Nachfolgend sind die Zusammensetzungen aller Medien bezogen auf 1 l Gesamtvolumen aufgeführt. Für feste Medien wurden jeweils 15 g Agar (Oxoid) zugegeben.

#### **Brain-Heart-Infusion Medium (BHI):**

Brain-Heart-Infusion	37,0 g
----------------------	--------

#### **C-Medium:**

Bacto™ Protease Peptone No.3	5,0	g
Hefeextrakt	15,0	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,7	g
NaCl	1,0	g
Magnesiumsulfat-7-hydrat	0,1	g
pH	7,4	

#### **Todd Hewitt Yeast Medium (THY):**

Todd-Hewitt Broth	36,4	g
Hefeextrakt	5,0	g

**Chemisch definiertes Medium (CDM):**

Entsprechend der Anleitung von van de Rien & Kessler (234) wurde aus verschiedenen Einzelkomponenten das Gesamtmedium zusammengestellt. Alle Einzelkomponenten wurden entweder aus bereitgestellten Stocklösungen (sterilfiltriert\*, bei 4°C gelagert) oder direkt als Feststoff zusammengegeben. Danach wurde das Medium sterilfiltriert\* und war für maximal 2 Wochen bei 4 °C haltbar. Direkt vor Gebrauch wurde dem Medium frisches  $\text{NaHCO}_3$  (Endkonzentration 2,5 g/l) und L-Cystein (Endkonzentration 0,5 g/l) zugesetzt.

(\* Porengröße 0,2 µm)

**2.1.4 Medienzusätze****Saliva-ähnliche Lösung:**

Lab Lemco Powder	1,00 g
Hefeextrakt	2,00 g
Proteose Pepton Nr. 3	5,00 g
Mucin	2,50 g
NaCl	0,35 g
KCl	0,20 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,48 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,34 g
pH	6,7

Nach dem Autoklavieren wurden 10 ml 5 %-ige sterilfiltrierte Harnsäure (Urea, [w/v]) zur auf etwa 55 °C abgekühlten Saliva-ähnlichen Lösung dazugegeben.

**Humanserum:**

Das Humanserum wurde kommerziell erworben (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim). Es stammt aus dem Vollblut eines männlichen Spenders mit der Blutgruppe AB, ist sterilfiltriert und immunologisch getestet.

**Tab. 2:** Zusätze

<b>Zusatz</b>	<b>Konzentration der Stammlösung</b>
Glukose	40 % [w/v], sterilfiltriert*
Fruktose	20 % [w/v], sterilfiltriert*
Mannose	20 % [w/v], sterilfiltriert*
Saccharose	20 % [w/v], sterilfiltriert*
FeCl <sub>3</sub>	10 mM
Spectinomycin	10 mg/ml <i>A. bidest.</i> , sterilfiltriert*
Tetrazyklin	10 mg/ml Ethanol (absolut, [v/v])
Penicillin G	10 mg/ml <i>A. bidest.</i> , sterilfiltriert*
Erythromycin	10 mg/ml Ethanol (absolut, [v/v])
Clindamycin	10 mg/ml <i>A. bidest.</i> , sterilfiltriert*
Rifampicin	10 mg/ml <i>A. bidest.</i> , sterilfiltriert*

(\* Porengröße 0,2 µm)

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

#### **10x PBS:**

KCl	2,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g
NaCl	80,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	14,2 g
pH	7,4

#### **Glutardialdehydlösung (2,5 %):**

100 ml 25 %-ige Glutardialdehydlösung (Merck, Darmstadt)

900 ml Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4), für 24 h bei 4 °C haltbar

#### **DNase I-Puffer:**

Glycerol (Merck)	50 %
Tris-HCl (pH 7,5)	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM

**Proteinase K-Puffer:**

Tris-HCl (pH 8) 10 mM

CaCl<sub>2</sub> 1 mM

sterilfiltriert\*

\* Porengröße 0,2 µm

**2.1.6 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe****Tab. 3:** Fluoreszenzfarbstoffe (Antikörper, Lebend/Tot Färbung und Lektine)

Bezeichnung	Firma
Kaninchen IgG gegen <i>S. pyogenes</i>	Biodesign, DUNN Labortechnik GmbH, Asbach
Ziege gegen Kaninchen IgG gekoppelt mit Alexa Fluor® 488	Molecular Probes, MoBiTec, Göttingen
Ziege gegen Kaninchen IgG gekoppelt mit Alexa Fluor® 647	Molecular Probes, MoBiTec, Göttingen
Kaninchen IgG gegen <i>S. pyogenes</i> gekoppelt mit FITC	Antikörper-online GmbH, Aachen
Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Concanavalin A gekoppelt mit Texas Red®	Invitrogen, Karlsruhe
WGA (wheat germ agglutinin) gekoppelt mit Alexa 647	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.7 Chemikalien und Enzyme

In der folgenden Tabelle 4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme aufgelistet, welche zur Herstellung von Puffern und Lösungen verwendet wurden. Weitere Lösungen und Enzyme sind im Zusammenhang mit den dazugehörigen Methoden angegeben.

**Tab. 4:** Chemikalien und Enzyme

Bezeichnung	Firma
Agar (Agar technical No. 3)	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
Brain-Heart-Infusion	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München
Calciumchlorid-Dihydrat ( $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck KGaA, Darmstadt
Clindamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DNase I	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Eisen(III)chlorid-Heptahydrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ )	Merck KGaA, Darmstadt
Erythromycin	Serva, Heidelberg
Ethanol (96 %, 70 %)	Zentralapotheke des Klinikums, Universität Rostock
Fibronektin (humanes Protein)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Fruktose	Merck KGaA, Darmstadt
Glukose	Merck KGaA, Darmstadt
Glutardialdehydlösung (25 %)	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt
Hefeextrakt	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
Humanserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kollagen Typ I (humanes Protein)	Rockland, Gilbertsville, USA
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck KGaA, Darmstadt
Di-Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	Merck KGaA, Darmstadt
Lab Lemco Powder	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England



L-Laktat-Dehydrogenase (LDH)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LB Broth Base	Invitrogen, Paisley, Schottland
Magnesiumchlorid-Heptahydrat ( $\text{MgCl}_2 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Mannose	Merck KGaA, Darmstadt
Mucin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Mutanolysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl-Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat $\times \text{H}_2\text{O}$	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NADH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
Penicillin G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phagenlysin C (PlyC)	Zur Verfügung gestellt von Daniel C. Nelson, PhD., University of Maryland Biotechnology Institute, Rockville MD
Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Proteose Pepton Nr. 3	BD, Sparks, USA
Rifampicin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Safranin Pulver	Certistain; J. T. Baker (Deventer, Holland)
Saccharose	Serva, Heidelberg
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Spectinomycin Dihydrochlorid $\times 5 \text{H}_2\text{O}$	MP Biomedicals, LLC, Eschwege
Tetrazyklin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Todd-Hewitt Broth-Nährmedium (THB)	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
Tris (Trisma <sup>®</sup> Base)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	Merck KGaA, Darmstadt
Yeast Extract	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England

### 2.1.8 Laborgeräteausstattung

**Tab. 5:** Laborgeräteausstattung

Bezeichnung	Firma
Anaerobe Arbeitsstation (Box)	DWS Meintrup, Löhden-Holte
Analysenwaage Typ BP 4100S	Sartorius, Göttingen
Biofuge Pico	Heraeus, Osterode
Brutschrank Typ B6060	Heraeus, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop BZ 8000	Keyence, Neu-Isenburg
Gefrierschrank -80°C Typ Hera freeze	Heraeus, Hamburg
Heizblock Typ Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Inkubator, wasserummantelt, geregelte CO <sub>2</sub> -Atmosphäre	Heraeus, Hamburg
Konfokales Laserscanning Mikroskop Leica TCS SP2 AOBS	Leica Microsystems, Wetzlar
Laborwaagen	Sartorius, Göttingen
Lichtmikroskop Olympus CKX-41	Olympus, Hamburg
pH Meter inoLab® pH 720	WTW GmbH, Weilheim
pH Meter Typ MP 220	Denver Instrument GmbH, Göttingen
Photometer SmartSpec™ 3000	BioRad, Hercules CA, USA
Schlauchpumpe ECOLINE VC-360	ISMATEC, Wertheim-Mondfeld
Sorvall RC5C Plus (Dupont) mit SS34-Rotor	Thermo Electron Corporation, USA
Spektralphotometer	Tecan Spectra Reader Classic, Tecan Trading AG
Spektrophotometer	BioRad Laboratories, Hercules CA, USA
Sterilbank Typ antair BSK	Telstar, USA
Sterilbank Arone Typ FC-640	Safelab Systems LTD, England
Zählkammer	Neubauer
Zentrifuge Varifuge 3.OR	Heraeus, Hamburg

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Wachstumsuntersuchungen

Für das Erstellen von Wachstumskurven wurde *S. pyogenes* aus einer ÜNK des zu untersuchenden Serotyp-Stammes (10 ml) in einer 1:20 Verdünnung in eine Hauptkultur (30 ml) inokuliert. Diese wurde unter entsprechenden Bedingungen (mit und ohne Mediumzusätzen, aerob bei 5 % CO<sub>2</sub> und 20 % O<sub>2</sub> Atmosphäre bzw. anaerob bei 5 % CO<sub>2</sub>, 2 % H<sub>2</sub> und 96 % N<sub>2</sub> Atmosphäre im Anaerobeninkubator) inkubiert.

Durch eine stündliche Probennahme (800 µl) konnte das Wachstum der Bakterien mittels photometrischer Bestimmung der optischen Dichte (OD<sub>600nm</sub>) in Halb-Mikro-Küvetten (Sarstedt AG + Co., Nümbrecht) im Spektrophotometer (Bio-Rad-Laboratories, Hercules CA, USA) verfolgt werden. Als Referenz diente das entsprechende Medium ohne Bakterieninokulation. Parallel zur Bestimmung der optischen Dichte wurde jeweils alle zwei Stunden der pH-Wert des Mediums gemessen.

### 2.2.2 Anzucht von Biofilmen unter statischen Bedingungen (Batchkultur)

Ein etabliertes *in vitro* Biofilmmodell stellt die Grundlage zur Durchführung von verschiedenen Biofilmstrukturanalysen dar. Dafür wurden Bakterien in 96-Well und 24-Well Mikrotiterplatten (Tissue Culture Plate, 96W; 24W; Cellstar®, Bio-one GmbH, Frickenhausen) über einen definierten Zeitraum als Biofilm in einer Batchkultur bei 37 °C [nach Lembke *et al.* (136), modifiziert] herangezüchtet.

Ausgehend von den Stammkulturen der verschiedenen *S. pyogenes* Serotyp-Stämme wurden jeweils 10 ml BHI + 0,5 % Glukose (w/v) beimpft, für 24 h bei 37 °C inkubiert, am nächsten Versuchstag in der Varifuge 3.0 für 5 min bei 4.000 Upm sedimentiert und jeweils zweimal mit 1 ml 1x PBS gewaschen. Das nach dem letzten Waschvorgang erhaltene Zellsediment wurde in 1 ml 1x PBS suspendiert und die optische Dichte (OD<sub>600nm</sub>) der Zellsuspension auf den Wert von 0,5 in 1x PBS eingestellt. Dies entspricht einer Zellzahl von ca. 10<sup>7</sup> Zellen/ml für *S. pyogenes*.

Für alle Biofilmversuche wurden die Bakterienzellen in den entsprechenden Medien 1:1.000 verdünnt, was einer Endkonzentration von ca. 10<sup>4</sup> Bakterienzellen/ml entspricht. Anschließend erfolgte die Inokulation von je 200 µl (96-Well Mikrotiterplatten) bzw. 1 ml (24-Well Mikrotiterplatten) Bakteriensuspension pro Well. Die Inkubation erfolgte über verschieden definierte Zeiträume unter oben genannten Bedingungen.

Je nach Serotyp-Stamm wurden die Kavitäten der Mikrotiterplatten ggf. einen Tag vor der Inokulation der Bakterien mit Matrixproteinen beschichtet. Hierzu wurden die Mikrotiterplatten mit jeweils 5 µg Fibronectin (M2-Stamm) oder Kollagen Typ I (M18-Stamm) pro Kavität in 1x PBS für 24 h bei 4 °C inkubiert und die Lösungen vor Applikation der Bakterien durch Absaugen entfernt. Für den Serotyp M6-Stamm erfolgte keine Beschichtung, da vorhergehende Untersuchungen gezeigt haben, dass dieser auf reinen Plastikoberflächen adhärieren kann (136).

### **2.2.3 Fluoreszenzmarkierung**

#### *2.2.3.1 Vitalitätsnachweis mittels Lebend/Tot-Färbung*

Für diese Arbeit wurde das Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit von Invitrogen genutzt. Diese Färbelösung besteht aus zwei Komponenten, dem grünen Farbstoff Syto 9 (480/500 nm) und dem roten Farbstoff Propidiumiodid (490/635 nm). Beide unterscheiden sich neben ihren spektralen Eigenschaften auch in ihrer Fähigkeit, durch bakterielle Membranen zu diffundieren. Während Syto 9 in der Lage ist sowohl intakte als auch zerstörte Membranen zu durchdringen, kann Propidiumiodid nur durch zerstörte Membranstrukturen dringen. Sind beide Fluoreszenzfarbstoffe anwesend, verdrängt Propidiumiodid den gebundenen Fluoreszenzfarbstoff Syto 9 und dadurch fluoreszieren die Bakterien rot.

Beide Fluoreszenzkomponenten wurden 1:1 gemischt, 1:1.000 in 1x PBS verdünnt und auf die Biofilme gegeben, nachdem das überschüssige Kulturmedium verworfen wurde. Die Färbung erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur (RT) unter Lichtausschluss und wurde anschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop (Keyence BZ 8000) begutachtet.

### 2.2.3.2 Fluoreszenzfarbstoffe zum Nachweis von EPS-Strukturen

Eine weitere Möglichkeit der Fluoreszenzmarkierung ist die Färbung von Biofilmstrukturen mit Hilfe von Lektinen (Kap. 2.1.6.). Im Rahmen dieser Arbeit wurden das Concanavalin A (ConA), gekoppelt mit einem Texas Red Farbstoff (Ex: 595 nm, Em.: 615 nm), das Wheat Germ Agglutinin (WGA), gekoppelt mit einem Alexa Fluor 647 Farbstoff (Ex.: 650, Em.: 665) sowie das Phytohämagglutinin-L (PHA) gekoppelt mit Alexa Fluor® 488 (Ex.: 495, Em.: 519) zur Darstellung von extrazellulären Matrixkomponenten verwendet.

Die verwendeten Farbstoffe weisen verschiedene Bindungseigenschaften auf. Während ConA an  $\alpha$ -Mannopyranosyl und  $\alpha$ -Glucopyranosyl Resten bindet, besitzt WGA eine Spezifität zu N-acetylglukosamin und N-acetylneuraminsäure (Sialinsäure). Das Lektin PHA bindet bevorzugt an Glykoproteine.

Die Visualisierung der EPS-Strukturen erfolgte in Kombination mit der Färbung der *S. pyogenes* Biofilmzellen. Dafür wurden verschiedene *S. pyogenes* Antikörper (AK) verwendet, wie z. B. ein Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) gekoppelter AK (Kap. 2.1.6.). Zunächst wurden die Biofilme angezüchtet (Kap. 2.2.2.) und nach definierter Inkubationszeit anschließend das überschüssige Medium verworfen. Nach einmaligem Waschen mit 1x PBS erfolgte die Markierung mit dem primären AK (Kaninchen IgG gegen *S. pyogenes*, 1:5000 Verdünnung) für eine Stunde bei RT. Nach gründlichem dreimaligem Waschen mit 1x PBS wurde der sekundäre AK (Ziege gegen Kaninchen IgG gekoppelt mit Alexa Fluor® 488 bzw. 647, 1:500 Verdünnung) auf die Zellen gegeben und nochmals für 45 Minuten im Dunklen inkubiert.

Im Anschluss an die Färbung der Bakterienzellen (grüne bzw. rote Fluoreszenz) erfolgte die Farbmarkierung der EPS-Strukturen. ConA-Stocklösungen (5 mg/ml) wurden in 0,1 M Natriumbicarbonatpuffer (pH 8) angesetzt und die Aliquots bei -20 °C gelagert. Für die Färbung wurde eine Arbeitskonzentration von 100 µg/ml eingesetzt. WGA-Stocklösungen (1 mg/ml in 1x PBS) wurden als Aliquots bei -20 °C gelagert. Als Endkonzentration für die Färbung wurden 10 µg/ml eingesetzt. PHA wurde als Stocklösung (2 mg/ml in dest. Wasser) ebenfalls bei -20 °C in Aliquots gelagert. Davon wurde eine Arbeitskonzentration von 100 µg/ml verwendet.

Für die Versuche wurden die Mediumüberstände der Biofilmkulturen verworfen und mit der Färbelösung vorsichtig überschichtet. Die Färbung erfolgte im Dunkeln für 10 min bei RT und anschließend konnten die EPS-Biofilmstrukturen mikroskopiert werden.

#### 2.2.4 Laktat-Dehydrogenase (LDH) Aktivitätsmessung

*S. pyogenes* ist in der Lage, Kohlenhydrate über den Stoffwechselweg der homofermentativen Milchsäuregärung abzubauen, um somit Energie in Form von ATP zu gewinnen. Am Ende dieser Glykolyse wird Pyruvat mit Hilfe der L-Laktat-Dehydrogenase (LDH) zu Laktat reduziert sowie das essentielle Nicotinamidadenindinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) durch Oxidation von  $\text{NADH}+\text{H}^+$  regeneriert (90, 91, 165, 206).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie lange *S. pyogenes* Biofilmzellen bei einer Langzeitkultivierung von bis zu zehn Tagen noch einen aktiven Stoffwechsel besitzen und damit noch lebensfähig sind.

Nach der Kultivierung der Biofilme über definierte Inkubationszeiten in 24-Well Mikrotiterplatten wurde das überschüssige Medium verworfen und die Vertiefungen mit je 1 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,8) vorsichtig gewaschen. Danach erfolgte die Ablösung der adhärennten Biofilmzellen von der Oberfläche mit 1 ml Phosphatpuffer. Zur Lyse der Zellen wurde 1  $\mu\text{l}$  Phagenlysin C zugegeben, für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend in der Eppendorf Zentrifuge 5417 R für 10 min bei 11.000 Upm zentrifugiert. Mit dem erhaltenen Proteinlysate im Überstand erfolgten die LDH-Aktivitätsbestimmungen. Da NADH, im Gegensatz zu  $\text{NAD}^+$ , Licht mit einer Wellenlänge von 340 nm absorbiert und mit der Reduktion eines Pyruvatmoleküls zu Laktat die Oxidation eines  $\text{NADH}+\text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$  einhergeht, erfolgte die Bestimmung der LDH-Aktivität indirekt über die photometrische Messung des NADH-Umsatzes.

Hierzu wurden 800  $\mu\text{l}$  Natriumphosphatpuffer (pH 6,8), 25  $\mu\text{l}$  Fruktose-1,6-bisphosphatlösung (20 mM), 25  $\mu\text{l}$  NADH-Lösung (6,74 mM) und 50  $\mu\text{l}$  Proteinlysate zusammen in ein Eppendorf Gefäß pipettiert und in einem Thermoblock auf 37 °C vorgewärmt. Das Substrat, die Natriumpyruvatlösung (100 mM), wurde ebenfalls auf 37 °C gebracht. Die 900  $\mu\text{l}$  Probenmix wurden mit 100  $\mu\text{l}$  vorgewärmter Natriumpyruvatlösung versetzt und sofort die Ausgangsabsorption bei 340 nm gemessen. Die nächsten Messungen erfolgten alle 60 Sekunden für die Dauer von insgesamt drei Minuten. Parallel wurden eine Negativkontrolle, die anstatt des Proteinlysates 50  $\mu\text{l}$  Wasser enthielt, sowie eine Positivkontrolle mit 50  $\mu\text{l}$  L-Laktat-Dehydrogenase (1:1000 Verdünnung in Natriumphosphatpuffer, Roche, Mannheim) mitgeführt.

Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Absorptionsveränderung  $\Delta E$  pro Minute. Die Menge an umgesetztem NADH konnte anschließend anhand der folgenden Formel berechnet werden:

$$c(\text{NADH}) = \frac{V_{(E)} \times \Delta E}{V_{(P)} \times \epsilon_{(\text{NADH})} \times d}$$

$V_{(E)}$  = Endvolumen = 1 ml

$V_{(P)}$  = Probenvolumen = 0,05 ml

$\Delta E$  = Absorptionsänderung (bei 340 nm) pro Minute

$\epsilon_{(\text{NADH})}$  = Extinktionskoeffizient  $6220 \text{ l/mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

$d$  = Schichtdicke der Küvette = 1 cm

Eine Unit LDH-Aktivität wurde als Umsatz von 1  $\mu\text{mol}$  NADH pro Minute definiert, sowie die LDH-Aktivität anschließend zur Proteinkonzentration in der Probe in Bezug gesetzt und als U/mg ausgedrückt.

#### 2.2.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Proteinlysaten erfolgte mit der Bradford Methode (25, modifiziert). Zunächst wurde eine Eichgeraden mit BSA erstellt. Dafür wurden sechs serielle Verdünnungsstufen einer BSA-Lösung (0,125 mg/ml) mit *A. dest.* angesetzt und jeweils mit 25  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz (Bio-Rad, München) vermischt. Alle Proben wurden bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen den Referenzwert mit *A. dest.* gemessen. Die Proteinlysate wurden in einer 1:10 Verdünnung in *A. dest.* und 25  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz photometrisch gemessen und anschließend die Absorptionswerte in die Formel der Eichgeraden für die Berechnung der Proteinkonzentration übertragen.

### **2.2.5 Quantitativer Nachweis der Biofilmbildung mittels Safranin Test**

Eine einfache Methode der Biofilmquantifizierung ist die Färbung von Biofilmstrukturen mit verschiedenen Farbstoffen. In dieser Arbeit wurde die Biofilmbildung von *S. pyogenes* mit dem Farbstoff Safranin O (Certistain) detektiert (40, modifiziert). Safranin bindet sowohl an bakteriellen Oberflächen als auch an die extrazelluläre Matrix von Biofilmen und lässt somit quantitative Aussagen über den Bildungs- bzw. Reifungsprozess eines Biofilms zu.

Nach der Kultivierung der Biofilme über eine definierte Inkubationszeit in 96-Well Mikrotiterplatten (Kap. 2.2.2.1) wurde das überschüssige Medium verworfen und die Vertiefungen mit je 200 µl 1x PBS gewaschen. Danach wurde die Waschlösung verworfen und die auf der Oberfläche adhärenen Biofilmstrukturen mit jeweils 200 µl 0,1 %-iger Safraninlösung für etwa 15 min bei Raumtemperatur (RT) gefärbt. Anschließend wurde die Färbelösung aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatte abgenommen, nochmals mit je 200 µl 1x PBS das nicht gebundene Safranin abgewaschen und nach dem Verwerfen der Waschlösung für etwa 15-20 min getrocknet.

Die Färbungsintensitäten des gebundenen Safranins an den Biofilmstrukturen wurden mit einem Spektralphotometer (Tecan Spectra Reader Classic, Tecan Trading AG) bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen. Die Versuche erfolgten grundsätzlich als Dreifachansatz. Als Referenzwerte dienten jeweils drei Kavitäten, die mit Fibronectin, Kollagen Typ I oder ohne Proteinbeschichtung mit Medium als Kontrollen inkubiert wurden.

### **2.2.6 Mikroskopische Techniken**

Im Rahmen von wissenschaftlichen Untersuchungen bakterieller Strukturen kommt der Mikroskopie eine große Bedeutung zu. Unter Verwendung verschiedener mikroskopischer Verfahren ist es möglich, sowohl kleine strukturelle Unterschiede als auch die Verteilung von Bakterien innerhalb eines Biofilmverbundes mit Hilfe verschiedener Markierungsmöglichkeiten zu untersuchen.



### 2.2.6.1 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzfarbstoffe zeichnen sich dadurch aus, dass sie Licht mit einer größeren Wellenlänge (z. B. sichtbares Licht) als das Anregungslicht emittieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet.

Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen von *S. pyogenes* Biofilmen wurden die Kulturen in 24-Well Mikrotiterplatten auf Plastikplättchen (Nunc, Thermo Fisher Scientific GmbH & Co. KG, Langenselbold) angezüchtet (Kap. 2.2.2.1). Die Probenvorbehandlung bestand darin, dass der Mediumüberstand entfernt wurde. Durch das Waschen mit 1 ml 1x PBS wurden nicht adhärente Bakterienzellen entfernt. Danach erfolgte die Zugabe der verschiedenen Fluoreszenzfarbstofflösungen.

### 2.2.6.2 Konfokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM)

Die konfokale Laserscanning Mikroskopie ist eine neuere mikroskopische Methode, mit der ohne spezielle Präparationen in definierten Abständen ( $\mu\text{m}$ ) optische Schnitte durch die x-y-z-Ebenen des Untersuchungsobjektes gelegt werden können. So können aus einem zweidimensionalen Datensatz von optischen Serienschnitten („sections“) eine dreidimensionale Rekonstruktion erstellt und in Kombination mit digitaler Bildbearbeitung dynamische Strukturveränderungen am lebenden System untersucht werden.

Mit der CLSM ist es zudem bei entsprechender Ausstattung des Mikroskops möglich, das Untersuchungsobjekt mit mindestens zwei Kanälen und somit zwei Fluoreszenzsignalen gleichzeitig sequentiell zu scannen. Neben der normalen Fluoreszenz können auch weitere Beleuchtungstechniken wie die Hell- und Dunkelfeldmikroskopie in Kombination mit der Fluoreszenztechnik aufgenommen werden.

Ein in der Fluoreszenzmikroskopie bestehendes Problem ist die Primärfluoreszenz bzw. Autofluoreszenz von Objekten. Daher müssen für CLSM-Untersuchungen spezielle Kultivierungsgefäße verwendet werden. Für diese Arbeit wurden „Chamber slides“ mit speziellem Glasboden von der Firma Nunc zur Biofilmkultivierung genutzt. Diese können, je nach Fabrikat, aus unterschiedlichen Kammern bestehen. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte mittels Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit von Invitrogen, das eine Lebend/Tot-Färbung mit anschließender Visualisierung des gesamten Biofilms ermöglicht (Kap. 2.2.3.1).

Die Durchmusterung der Biofilmstrukturen erfolgte mit dem Konfokalen Laserscanning Mikroskop Leica TCS SP2 AOBS. Die Aufnahmen für diese Arbeit erfolgten mit einem HeNe (543/594 nm) und einem Argon Laser (488 nm). Mit einem 63x Objektiv wurden über

einen Photomultiplier im Mikroskop sowie unter Verwendung der *Leica Confocal Software* (LCS) konfokale Abbildungen der *S. pyogenes* Biofilme erstellt.

#### 2.2.6.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Im Vergleich zur Lichtmikroskopie bietet die Elektronenmikroskopie den entscheidenden Vorteil, das ein höheres Auflösungsvermögen und eine größere Tiefenschärfe erzeugt werden kann. Als „Lichtquelle“ wird in diesem Mikroskopieverfahren in einem Hochvakuum ein Elektronenstrahl genutzt, der Punkt für Punkt die Oberfläche abtastet. Die Detektion der verschiedenen Signalstärken wird dabei durch die Oberflächenbeschaffenheit der Probe bestimmt, somit können feine Details des Objektes untersucht werden.

Für REM-Aufnahmen müssen die zu untersuchenden Proben vakuumstabil (frei von Wasser, Lösungsmitteln und anderen Stoffen) sein. Die zu untersuchenden Biofilme wurden auf Deckgläschen in 24-Well Mikrotiterplatten für definierte Zeiträume inkubiert (Kap. 2.2.2.1). Danach wurde das überschüssige Medium verworfen und der Biofilm mit 1 ml 1x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung in 2,5 %-igem Glutardialdehyd für mindestens 24 h bei 4 °C. Nach der Fixierung wurde das Glutardialdehyd abgehoben und die fixierten Biofilme mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer dreimal gewaschen.

Für die folgenden Abläufe wurden die Deckgläschen mit den fixierten Biofilmpuben in spezielle Metallhalterungen gestellt und mit einer aufsteigend konzentrierten Ethanolreihe (gekühlt auf 4 °C) entwässert:

- Spülen der Probe mit 30 % Ethanol
- 5 min Inkubation in 50 % Ethanol
- 10 min Inkubation in 75 % Ethanol
- 10 min Inkubation in 90 % Ethanol
- 10 min Inkubation in 100 % Ethanol (2x)

Während des zweiten Entwässerungsvorganges mit 100 %-igem Ethanol wurde das Gerät für die Kritisch-Punkt-Trocknung (Emitech) auf 4 °C gekühlt.

Anschließend wurden die Proben in der Metallhalterung in die dafür vorgesehene Probenkammer des Gerätes gestellt. Der Deckel wurde verschlossen, die Kammer mit flüssigem CO<sub>2</sub> befüllt und für drei Minuten inkubiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Durch Aufheizen der Probenkammer auf maximal 32 °C und einer damit verbundenen Druckerhöhung auf 72 bar für 20 min konnte der „Kritische Punkt“ des Trocknens erreicht werden, bei dem das CO<sub>2</sub>-Ethanol-Gemisch vom flüssigen in den gasförmigen Aggregatzustand übergeht.

Die nun getrockneten Biofilmprouben wurden auf spezielle Prohenteller mit aufliegender elektrisch leitender Klebefolie aus einem Kohlefilm (Plano GmbH, Wetzlar) befestigt.

Zum Schluss wurde mit einem Spezialbedampfungsgerät (Sputter Coater, Baltec) ein dünner und gleichmäßiger Goldüberzug auf die getrocknete Biofilmproube aufgedampft. Diese konnte nun zur rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung verwendet werden. Die Durchführung der REM-Untersuchungen erfolgten am Elektronenmikroskopischen Zentrum (EMZ) des Instituts für Pathologie an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock.

### **2.2.7 Keimzahlbestimmung von Biofilmen**

Unter dem Begriff „Keimzahl“ versteht man die Gesamtheit aller Bakterien in einer Probe. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl (GZZ) erfolgte mittels einer Zählkammer, die Lebendkeimzahl (LKZ) wurde über serielle Verdünnungsreihen mit anschließendem Auszählen der Kolonien auf THY-Agarplatten bestimmt. Diese Methoden werden im Folgenden beschrieben.

#### 2.2.7.1 Gesamtzellzahlbestimmung (GZZ)

Für die Bestimmung der GZZ von *S. pyogenes* Biofilmen aus statischer Kultur wurde nach einem definierten Inkubationszeitraum das überschüssige Medium verworfen und der adhärente Biofilm mit 1 ml 1x PBS vorsichtig gewaschen. Danach wurden die Biofilmzellen mit Hilfe der Spitze einer Pipette von der Oberfläche abgeschabt und in 1 ml 1x PBS aufgenommen. Anschließend erfolgte eine serielle Verdünnung der konzentrierten Suspension von Biofilmzellen. Dafür wurden 100 µl von der Ausgangssuspension ( $=10^0$ ) in 900 µl 1x PBS ( $=10^{-1}$ ) gegeben, gut vermenget und daraus wiederum 100 µl in weitere 900 µl 1x PBS ( $=10^{-2}$ ) bis zu einer Verdünnungsstufe von  $10^{-6}$  verdünnt. Jeweils 10 µl einer Verdünnungsstufe wurden für die Zählung in einer Neubauer-Zählkammer verwendet. Es erfolgte die Auszählung von 6 Kleinquadraten mit anschließender Bestimmung des Mittelwertes (MW). Bei höheren Zellzahlen (ab 20 Zellen pro Quadrat) wurde die Zellsuspension der nächst höheren Verdünnungsstufe gezählt bzw. ein weiterer Verdünnungsschritt angeschlossen und aus dieser Suspension die Zählung vorgenommen. Der Mittelwert wurde mit dem Kammerfaktor (KF) sowie dem Verdünnungsfaktor (VF) der zu zählenden Zellsuspension multipliziert und es ergab sich daraus dann die GZZ/ml:

$$\text{MW der gezählten Zellen} \times 10^4 (\text{KF}) \times \text{VF} = \text{Gesamtzellzahl/ml}$$

#### 2.2.7.2 Lebendkeimzahlbestimmung (LKZ)

Wie in 2.2.7.1. für die Gesamtzellzahlbestimmung beschrieben, wurde aus der Ausgangszellsuspension mit 1x PBS eine serielle Verdünnungsreihe bis zu einer Verdünnungsstufe von  $10^{-6}$  (je nach Versuchsansatz) hergestellt. Nach Ausplattieren von jeweils 100 µl der letzten vier Verdünnungsstufen auf THY-Agarplatten und 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> konnte durch Auszählen der Kolonien auf den Platten die LKZ/ml berechnet werden.

## 2.2.8 Untersuchungen zur Biofilmmatrix-Zusammensetzung mit Hilfe von DNase I und Proteinase K

Die Wirkung von DNase I wurde sowohl zu Beginn der Biofilmbildung als auch auf bereits vorhandenen Biofilmstrukturen (prä-existente Biofilme) getestet. Letzteres gilt auch für die Versuche zur Enzymwirkung von Proteinase K auf *S. pyogenes* Biofilme.

Die Anzucht der Biofilme erfolgte wie unter Kap. 2.2.2 beschrieben. Die Dnase I wurde zum Zeitpunkt der Zellinokulation hinzugegeben bzw. nach definierten Inkubationszeiten von 24 h, 48 h und 72 h den prä-existenten Biofilmen in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt und für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Zugabe von Proteinase K erfolgte auf prä-existente Biofilme. Danach wurde, je nach Versuch, eine Biofilmmassebestimmung mittels quantitativem Safranin Test (Kap. 2.2.5.) und/oder eine strukturelle Charakterisierung mittels Fluoreszenz- oder Rasterelektronenmikroskopie (Kap. 2.2.6) der enzymbehandelten Biofilme durchgeführt. Als Kontrollen wurden Biofilme mitgeführt, die nur mit dem Puffer des entsprechenden Enzyms behandelt wurden.

## 2.2.9 Untersuchungen zur Biofilmstabilität

### 2.2.9.1 Wirksamkeit antimikrobieller Substanzen

In dieser Arbeit wurden handelsübliche Antibiotika (AB) getestet, die auch bei Streptokokkeninfektionen angewandt werden. Dazu zählen das  $\beta$ -Laktam-Antibiotikum Penicillin G (Sigma-Aldrich), das Makrolid-Antibiotikum Erythromycin (Serva), Tetrazyklin (Sigma-Aldrich), Rifampicin (Sigma-Aldrich) sowie das Lincosamid-Antibiotikum Clindamycin (Sigma-Aldrich).

Die minimale Hemmkonzentrationen (MHK) dieser Antibiotika wurden exemplarisch für den Serotyp M2-Stamm mit Hilfe der E-Test<sup>®</sup> Methode bestimmt. Dafür wurden die Bakterien auf Columbia-Agarplatten über Nacht bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurde mit einem sterilen Wattestäbchen Koloniematerial in sterile 0,9 %-ige NaCl Lösung gerieben bis eine  $OD_{600nm} = 0,5$  nach McFarland Standard erreicht war.

Daraufhin wurde wiederum mittels eines einmal in die Suspension getauchten sterilen Wattestäbchens die in der Watte enthaltenen Bakterien gleichmäßig auf der Oberfläche einer Blutagarplatte verteilt. Nach Einziehen der mitaufgebrachten Flüssigkeit in den Agar wurde mit einer sterilen Pinzette ein E-Teststreifen des zu untersuchenden Antibiotikums luftblasenfrei auf den Agar aufgelegt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

Atmosphäre für 24 h im Brutschrank mit anschließender Auswertung der Hemmhof-Ergebnisse nach Herstellerangaben.

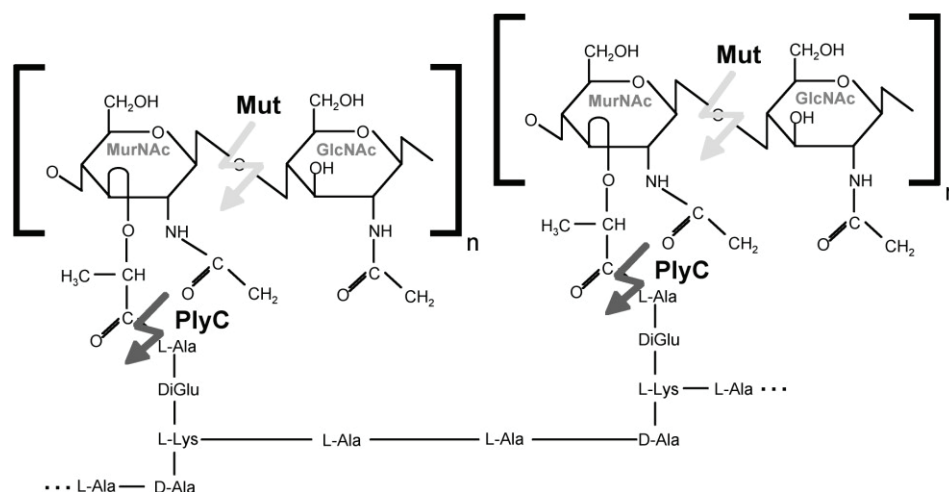
Die antibiotische Wirkung der Substanzen zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten wurde für *S. pyogenes* Biofilme unter statischen Kulturbedingungen mittels Safranin Test (Kap. 2.2.5.) quantifiziert.

Nach definierten Inkubationszeiträumen erfolgte der Austausch des verbrauchten Mediums durch frisches BHI Medium mit Zusatz des zu testenden Antibiotikums in verschiedenen Endkonzentrationen. Die maximalen Konzentrationen der Antibiotika lagen dabei um ein Vielfaches über der, mittels E-Test ermittelten, minimalen Hemmkonzentrationen (MHK).

### 2.2.9.2 Sensitivität gegenüber verschiedenen Lysinen

Für diese Arbeit wurden die kommerziell erhältliche Muraminidase Mutanolysin (Sigma-Aldrich, Steinheim) und PlyC, ein multimeres Lysin des Streptokokken-Bakteriophagen C<sub>1</sub> (162, 125), verwendet.

Mutanolysin ist eine N-Acetyl Muraminidase, die spezifisch die alternierenden  $\beta$ -glykosidischen Bindungen zwischen den beiden Grundbausteinen der Peptidoglykankette, N-Acetylglucosamin (GlcNac) und N-Acetylmuraminsäure (MNAc), spaltet. Die Zellwandhydrolyse durch PlyC (125) hingegen erfolgt durch die Abspaltung der Quervernetzung.



**Abb. 4:** Angriffspunkte der beiden Zellwandlysine Mutanolysin und PlyC. Mutanolysin spaltet vorwiegend  $\beta$ -glykosidische Bindungen zwischen dem C1-Atom von MNAc und dem C4-Atom von GlcNac. PlyC spaltet spezifisch die Quervernetzung des Rhamnoserrückgrat in der Peptidoglykankette (125).

Die adhärennten Biofilme in den Vertiefungen der 24-Well Mikrotiterplatten wurden jeweils nach definierten Inkubationszeitpunkten mit 1x PBS gewaschen. Nach Abschaben der Biofilme und Suspendieren der Bakterien in 1x PBS wurden die Biofilmlösungen in einem Endvolumen von 1 ml auf eine  $OD_{600nm} \sim 0,8 - 0,9$  eingestellt.

Die zu testenden Enzyme wurden in folgenden Endkonzentrationen eingesetzt: Mutanolysin = 250 U/ml (Stock: 5000 U/ 0,1 M K-Phosphat-Puffer, pH 6,2) und PlyC = 100 U/ml (Stock: 128.000 U/ml). Je nach Versuchsansatz wurden die Bakterien entweder nur mit einem Enzym oder mit einer Kombination beider Enzyme behandelt. Die Effekte des enzymatischen Zellwandabbaus wurden nach 5 min, 10 min, 15 min, 1 h und 24 h mittels Bestimmung der  $OD_{600nm}$  verfolgt.

### **2.2.10 Statistische Analysen**

Für die statistischen Analysen wurden alle Werte als Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen angegeben. Alle Mittelwerte aus den jeweiligen Parametern wurden aus mindestens drei unabhängigen Versuchsansätzen ermittelt.

### **2.2.11 Software**

Folgende Software wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Microsoft Office Programme (Word, Excel, PowerPoint) für die Erstellung von Texten, Tabellen und Grafiken.

Die Leica TCS SP2 AOBS Konfokale Laserscanning imaging Software, BZ observation application Software (Keyence, Neu-Isenburg) sowie BZ image analysis application Software (Keyence, Neu-Isenburg) für die Analyse der mit den entsprechenden Mikroskopen gewonnenen Bilder.

Die easyWin screening Software (TECAN GmbH, Crailsheim) für die Absorptionsmessungen im Rahmen der Safranin Tests von Biofilmen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung der Biofilmbildung und -struktur

Eine einfache und schnelle Methode zur quantitativen Bestimmung der *in vitro* Biofilmbildung von Bakterien ist der Safranin Test in 96-Well Mikrotiterplatten (Kap. 2.2.5). Damit können in kurzer Zeit eine Vielzahl von verschiedenen Versuchsparametern im Hochdurchsatzverfahren ausgetestet werden. Bereits 2005 wurde durch Lembke *et al.* (136) beschrieben, dass ausgewählte *S. pyogenes* Stämme der Serotypen M2, M6 und M18 in der Lage sind, Biofilmstrukturen unter definierten *in vitro* Bedingungen auszubilden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Faktoren zu identifizieren, die maßgeblich die Biofilmbildung dieser Serotyp-Stämme beeinflussen können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der Einfluss zahlreicher Substanzen und Kulturbedingungen auf die Biofilmbildung untersucht. Parallel wurden zudem als Kontrolle der Biofilm-spezifischen Effekte der Einfluss aller getesteten Parameter auf Flüssigkulturen von *S. pyogenes* Stämme der Serotypen M2, M6 und M18 (= planktonische Zellen) untersucht.

Daten zum Wachstum dieser planktonischen Zellen und pH-Wertveränderungen des Kulturmediums über die Inkubationszeit von Batchkulturen sind im Anhang (Kap. 7) zusammengefasst.

#### 3.1.1 *S. pyogenes* Biofilmbildung in Gegenwart verschiedener Kohlenstoffquellen

Für viele Bakterienspezies wird gezeigt, dass sowohl das Wachstum als auch die Biofilmentwicklung wesentlich vom Nährstoffangebot im Wachstumsmedium beeinflusst werden können (148, 112, 63). Eine wichtige Rolle spielt dabei das Vorhandensein von essentiellen Kohlenstoffquellen (C-Quellen) (119, 181), die u. a. die Biofilmbildung hemmen können und deren Umsetzung mit einer veränderten Genexpression einher geht (205, 210, 215).

Dazu wurden verschiedene C-Quellen und Kulturmedien untersucht. In weiteren Ansätzen wurden die verschiedenen Zusätze und unterschiedlichen Inkubationsbedingungen getestet.

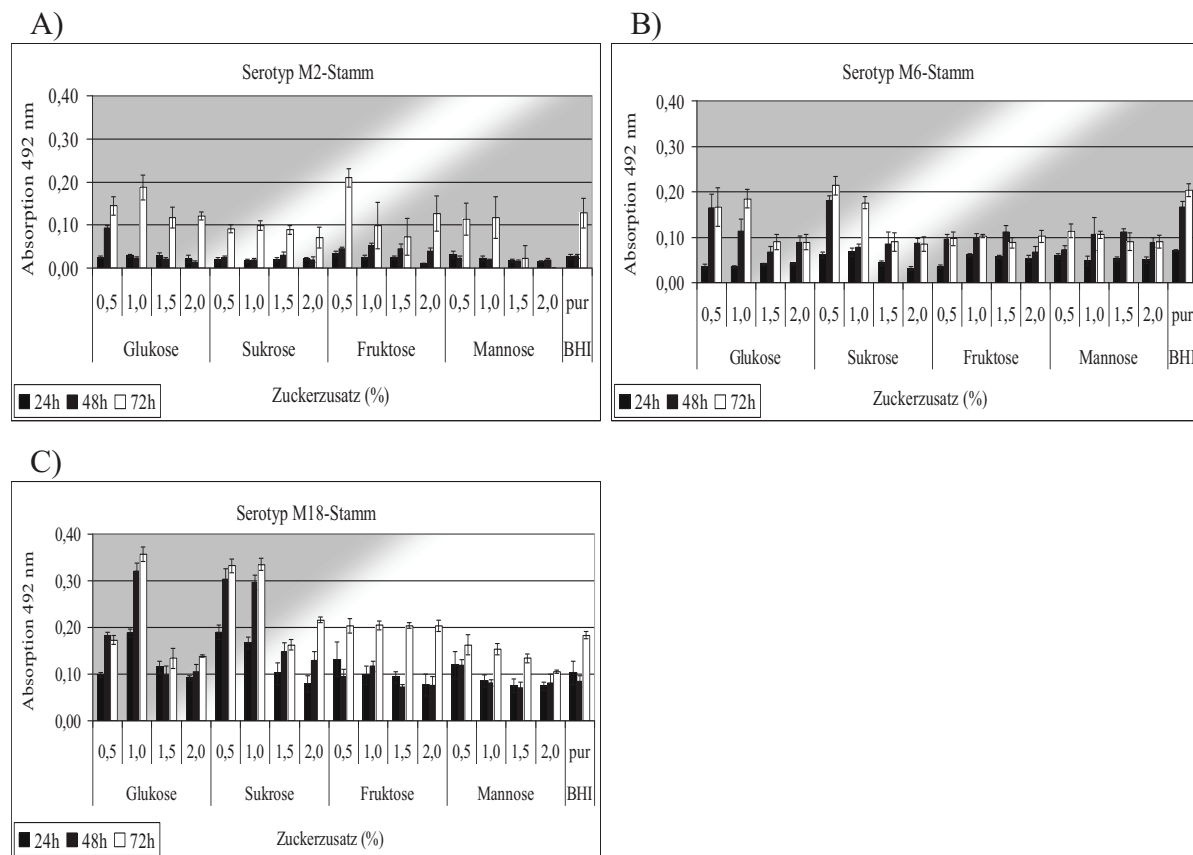


### 3.1.1.1 Quantitative Biofilmuntersuchungen

Die initiale Voraussetzung für die Biofilmbildung ist die Adhärenz von *S. pyogenes* an Oberflächen. Um diesen Vorgang zu induzieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit vor der Inokulation der Bakterien die Vertiefungen der Mikrotiterplatten mit Fibronectin (M2) bzw. Kollagen Typ I (M18) beschichtet (Kap. 2.2.2). Hierbei wurde die Fähigkeit der Bakterien, an Serumproteine und extrazellulären Matrixproteinen der Wirtszelle zu binden, für die *in vitro* Biofilmversuche ausgenutzt.

Als Wachstumsmedium wurde das BHI Medium gewählt, da es schon in mehreren Biofilmstudien als optimales Kulturmedium beschrieben wurde (136). In den folgenden Untersuchungen wurden als Kohlenstoffquellen die Monosaccharide Glukose, Fruktose und Mannose sowie das Disaccharid Saccharose getestet. Neben dem Einfluss des prinzipiellen Vorhandenseins dieser C-Quellen sollten auch konzentrationsabhängige Effekte auf das Biofilmwachstum untersucht werden. Daher wurden die Zucker in den entsprechenden Versuchen in Konzentrationen zwischen 0,5 % und 2 % (w/v) eingesetzt.

In der folgenden Abbildung 5 ist die Biofilmbildung der *S. pyogenes* Stämme der Serotypen M2, M6 und M18 über einen Zeitraum von drei Tagen unter Zusatz verschiedener Konzentrationen der genannten Zucker dargestellt. Der Schwellenwert, ab dem von einem Biofilm gesprochen werden kann, wurde aufgrund der Daten in Vorversuchen erlangten Ergebnisse bei einer Absorption von  $\geq 0,05$  definiert (136). Als Referenzwert wurde die Biofilmbildung in reinem BHI Medium ohne externe Zugabe von Zucker herangezogen.



**Abb. 5:** Safranin Test zur quantitativen Bestimmung der Biofilmbildung von *S. pyogenes* Stämmen der Serotypen M2 (A), M6 (B) und M18 (C) in BHI Medium. Der Versuch wurde in 96-Well Mikrotiterplatten über einen Zeitraum von drei Tagen durchgeführt. Die Färbung mit Safranin erfolgte jeweils alle 24 Stunden mit anschließender Absorptionsmessung bei 492 nm. Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus mind. drei unabhängigen Versuchen.

Die Ergebnisse verdeutlichen die Unterschiede innerhalb der einzelnen M-Serotypen. Der Serotyp M2-Stamm zeigte nach 48 Stunden (in Gegenwart von 0,5 % Glukose) bzw. 72 Stunden Inkubation eine verstärkte Biofilmbildung in Gegenwart von relativ geringen Mengen Glukose und Fruktose (Abb. 5, A). Höhere Mengen aller vier Zucker reduzierten dagegen eher die Biofilmmasse dieses Stammes.

Der Serotyp M6-Stamm zeigte ein ähnliches Wachstumsverhalten, nur das hier geringe Konzentrationen an Glukose und Saccharose Biofilm-stimulierende Effekte hatten (Abb. 5, B). Auch beim Serotyp M18-Stamm führte der Zusatz von Glukose und Saccharose zum Medium in geringen Konzentrationen zu einer Zunahme der Biofilmmasse (Abb. 5, C). Allerdings war im Vergleich zu den anderen beiden Stämmen die Hemmung von größeren Zuckerkonzentrationen auf das Biofilmwachstums weniger bis kaum wahrnehmbar ausgeprägt.

Das unterschiedliche Verhalten der Biofilmentwicklung der untersuchten Stämme gibt somit erste Hinweise auf einen Einfluss der C-Quelle für die Ausbildung von Biofilmstrukturen. Zusätzlich konnte durch die Untersuchungen gezeigt werden, dass diese Effekte Serotyp-spezifisch sind.

Die Ergebnisse der Wachstumsuntersuchungen planktonischer Zellen zeigten keine Beeinflussung des Wachstums von *S. pyogenes* unter dem Einfluß verschiedener und unterschiedlich konzentrierter C-Quellen in BHI Medium (Kap. 7, Abb. A1). Somit konnten die erhaltenen Resultate auf Biofilm-spezifische Effekte zurückgeführt werden.

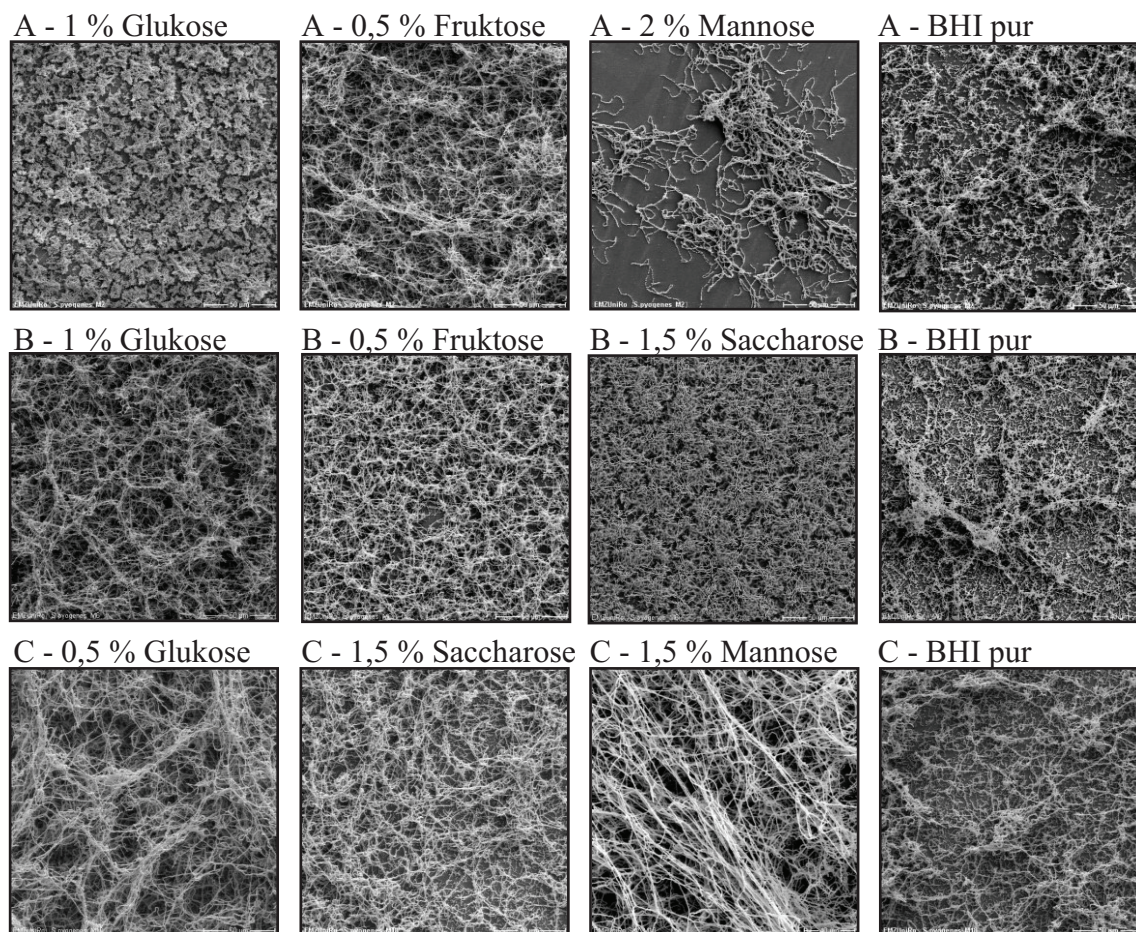
#### 3.1.1.2 Morphologische Charakterisierung

Zur Beurteilung struktureller Veränderungen der Biofilmarchitektur durch die Präsenz verschiedener C-Quellen bei den einzelnen Serotyp-Stämmen wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM) von drei Tage alten Biofilmen erstellt. Zu diesem Zeitpunkt ist die Biofilmreifung am weitesten fortgeschritten und ist daher gut für Strukturanalysen geeignet. Dafür eignet sich besonders gut die Methode der Rasterelektronenmikroskopie (REM), mit der bereits kleinere Strukturveränderungen an den Zellen bzw. im Biofilm besonders effizient beobachtet werden können (Kap. 2.2.6.3).

In der Abbildung 6 sind repräsentative REM-Aufnahmen von den mit verschiedenen Zuckerzusätzen getesteten Stämmen dargestellt. Die Resultate der REM-Dokumentation ergänzten und modifizierten die Ergebnisse der Safraninmessungen (Kap. 3.1.1.1). Eine externe Zugabe von verschiedenen Zuckern erhöhte selbst bei höheren Konzentrationen in den meisten Konstellationen deutlich die Zellzahl im Biofilm und veränderte zudem die Struktur gegenüber dem Wachstum in BHI Medium. In aller Regel erscheinen die Biofilme nach Zuckerzusatz lockerer strukturiert.

Ausnahmen hiervon waren nur am Serotyp M2-Stamm und Glukose bzw. dem M6-Stamm und Saccharose zu erkennen. Typischerweise war in den locker strukturierten Biofilmen auch die Länge der Streptokokkenketten deutlich erhöht. Die Unterschiede zwischen der Safraninmessung und den REM-Bildern ergaben sich aus der Tatsache, das erstere maßgeblich die EPS des jeweiligen Biofilms anfärbt und messbar macht, während letzteres die Zellen der Biofilme darstellt.

Zusammenfassend betrachtet zeigten diese Resultate deutlich, dass die Präsenz von verschiedenen C-Quellen nicht nur zu unterschiedlichen Biofilmmassen, sondern auch zu strukturellen Unterschieden in der Biofilmarchitektur führen kann.



**Abb. 6:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *S. pyogenes* Biofilmstrukturen. Die Biofilme wurden für drei Tage in BHI Medium mit unterschiedlichen Zuckerzusätzen inkubiert und anschließend für die REM-Aufnahmen präpariert. Für die Stämme der Serotypen M2 (A), M6 (B) und M18 (C) wurden die Biofilme in BHI Medium mit unterschiedlichen Zucker und -konzentrationen inkubiert. Vergrößerung 500-fach.



### 3.1.2 Einfluss verschiedener Faktoren und Kulturbedingungen

Bakterielle Biofilme sind immer wieder Schwankungen ihrer Umgebungsverhältnissen ausgesetzt. Sie müssen in der Lage sein, sich diesen unregelmäßig aber ggf. häufig veränderten Umweltbedingungen (Nährstoffangebot, Schwankungen im pH-Wert, Speichelfluss der Mundhöhle etc.) anzupassen, um überleben zu können (87, 96).

Um solche Einflüsse im vorliegenden *in vitro* Modell im Einzelnen untersuchen zu können, wurde in den weiteren Experimenten ein einheitliches Kulturmedium verwendet. Damit waren Medieumeinflüsse weitestgehend ausgeschlossen. Aus den vorangegangenen Biofilmmessungen mit den drei Stämmen erwies sich das BHI Medium mit einem Zusatz von 0,5 % Glukose als am ehesten geeignetes Kulturmedium.

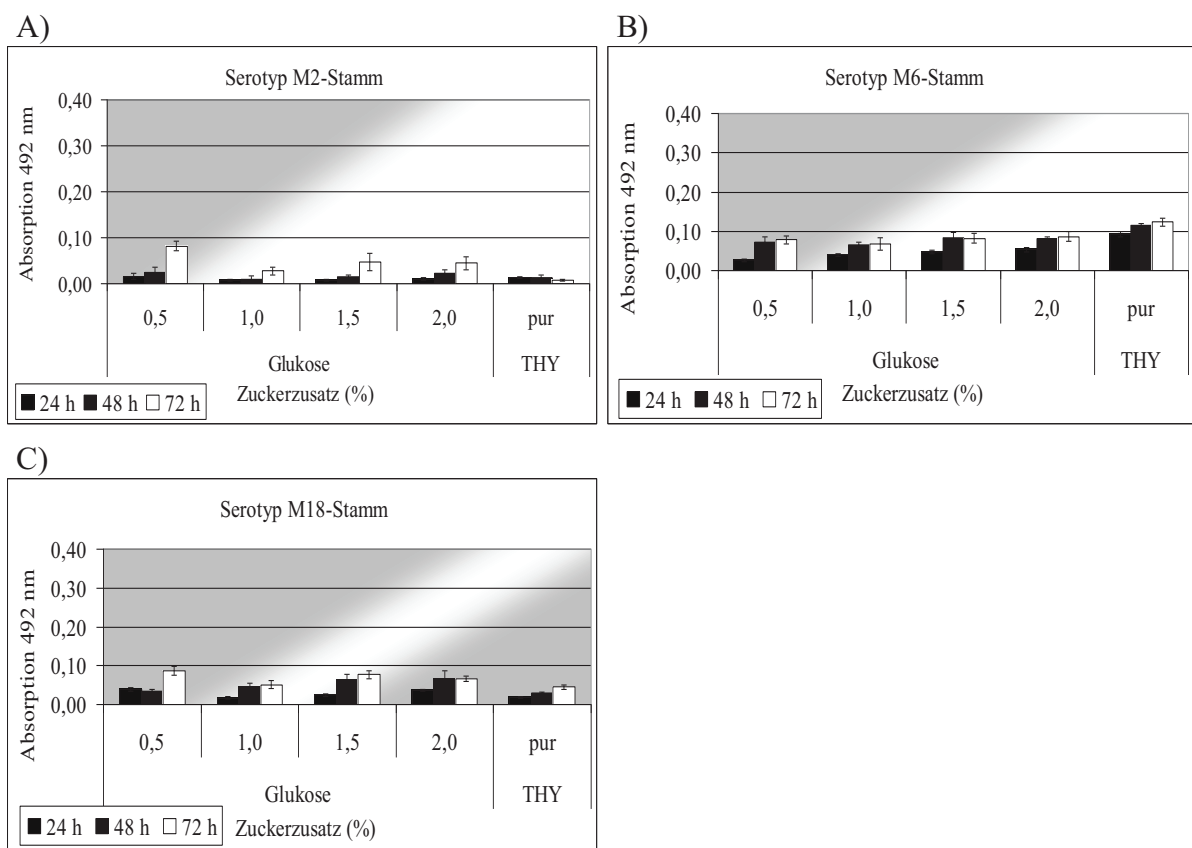
Im Vergleich dazu wurden nun verschiedene Kulturmedien mit dem Zusatz von Glukose in unterschiedlichen Konzentrationen getestet, um einen eventuellen Einfluss anderer Substratkomponenten auf die *S. pyogenes* Biofilmbildung zu identifizieren.

#### 3.1.2.1 Austestung verschiedener Komplex- und Minimalmedien

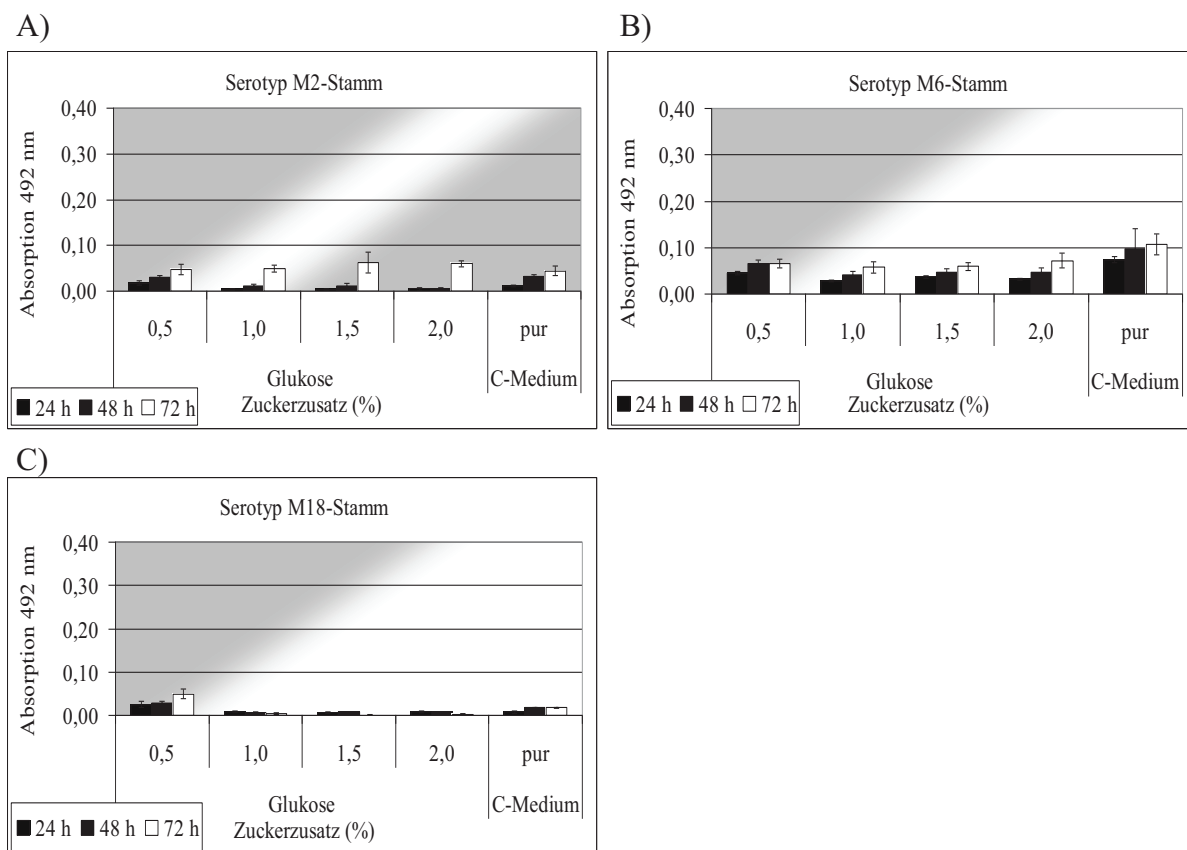
In Biofilmstudien verschiedener pathogener Keime wurden neben dem BHI Medium auch weitere Kulturmedien genutzt. In dieser Arbeit erfolgten die Untersuchungen mit THY Medium, dem CDM und C-Medium, inwieweit diese die Biofilmbildung von *S. pyogenes* unterstützen oder einen gegensätzlichen Effekt hervorrufen.

Das THY Medium ist wie das BHI Medium ein weiteres Komplexmedium. Neben diesen Komplexmedien wurden auch zwei Minimalmedien für die Biofilmuntersuchungen herangezogen. Zum einen handelt es sich um ein chemisch definiertes Medium (CDM), dass speziell für das planktonische Wachstum von Streptokokken konzipiert wurde (234). Das C-Medium ist bereits für die Biofilmkultivierung beschrieben worden (149) und sollte in dieser Arbeit für Streptokokken ausgetestet werden. Für alle hier getesteten Medien wurden neben der Glukosestandardkonzentration von 0,5 % zusätzlich drei weitere Konzentrationen (1 %, 1,5 % und 2 %) getestet.

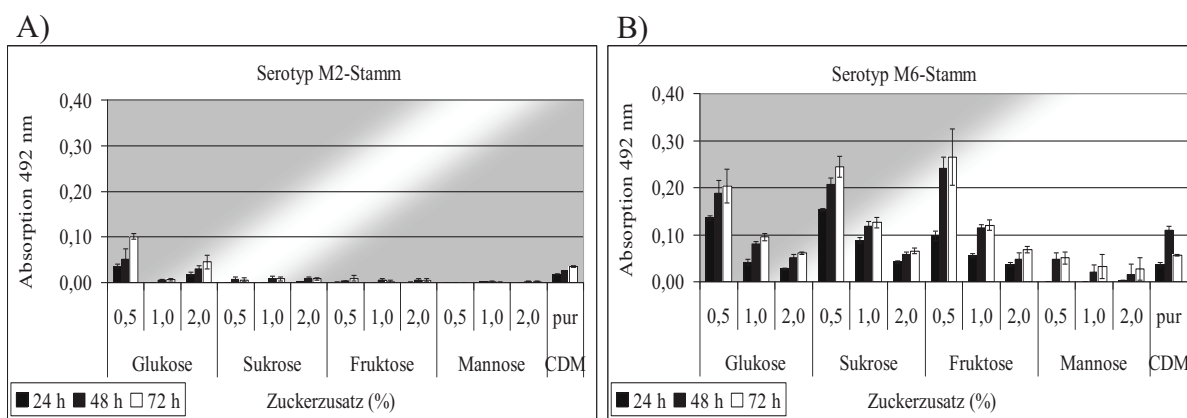
Eine Zusammenfassung ausgewählter Ergebnisse wird in den Abbildungen 7a-c dargestellt. Das Komplexmedium THY (Abb. 7a) und das C-Medium (Abb. 7b) erwiesen sich für alle getesteten *S. pyogenes* Stämme für eine Biofilmbildung als ungeeignet. Dies trifft bei den Stämmen der Serotypen M2 und M18 auch für das CDM Medium zu (Abb. 7c). Im Gegensatz zu diesen beiden Stämmen konnte für den Serotyp M6-Stamm in CDM Medium eine gute Biofilmbildung detektiert werden. Demzufolge können bestimmte Substanzen im CDM Medium Serotyp-spezifisch die Ausprägung von Biofilmstrukturen beeinflussen. Diese Daten verdeutlichen, dass die Mediunzusammenstellung eine entscheidende Rolle für die Ausbildung von Biofilmen spielt.

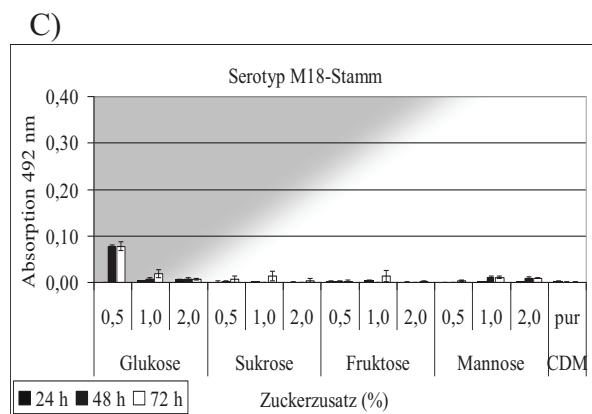


**Abb. 7a:** Quantitative Bestimmung der Biofilmbildung in THY Medium mit verschiedenen Glukosekonzentrationen mittels Safranin Test alle 24 Stunden mit anschließender Absorptionsmessung bei 492 nm. Die Dokumentation der Biofilmentwicklung erfolgte über einen Zeitraum von drei Tagen. Dargestellt sind die Resultate für die Stämme der Serotypen M2 (1), M6 (2) und M18 (3). Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus mind. drei unabhängigen Versuchen.



**Abb. 7b:** Quantitative Bestimmung der Biofilmbildung in C-Medium mit verschiedenen Glukosekonzentrationen mittels Safranin Test alle 24 Stunden mit anschließender Absorptionsmessung bei 492 nm. Die Dokumentation der Biofilmentwicklung erfolgte über einen Zeitraum von drei Tagen. Dargestellt sind die Resultate für die Stämme der Serotypen M2 (1), M6 (2) und M18 (3). Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus mind. drei unabhängigen Versuchen.





**Abb. 7c:** Quantitative Bestimmung der Biofilmbildung in CDM mit verschiedenen Zuckerzusätzen mittels Safranin Test alle 24 Stunden mit anschließender Absorptionsmessung bei 492 nm. Die Dokumentation der Biofilmentwicklung erfolgte über einen Zeitraum von drei Tagen. Dargestellt sind die Resultate für die Stämme der Serotypen M2 (1), M6 (2) und M18 (3). Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus mind. drei unabhängigen Versuchen.

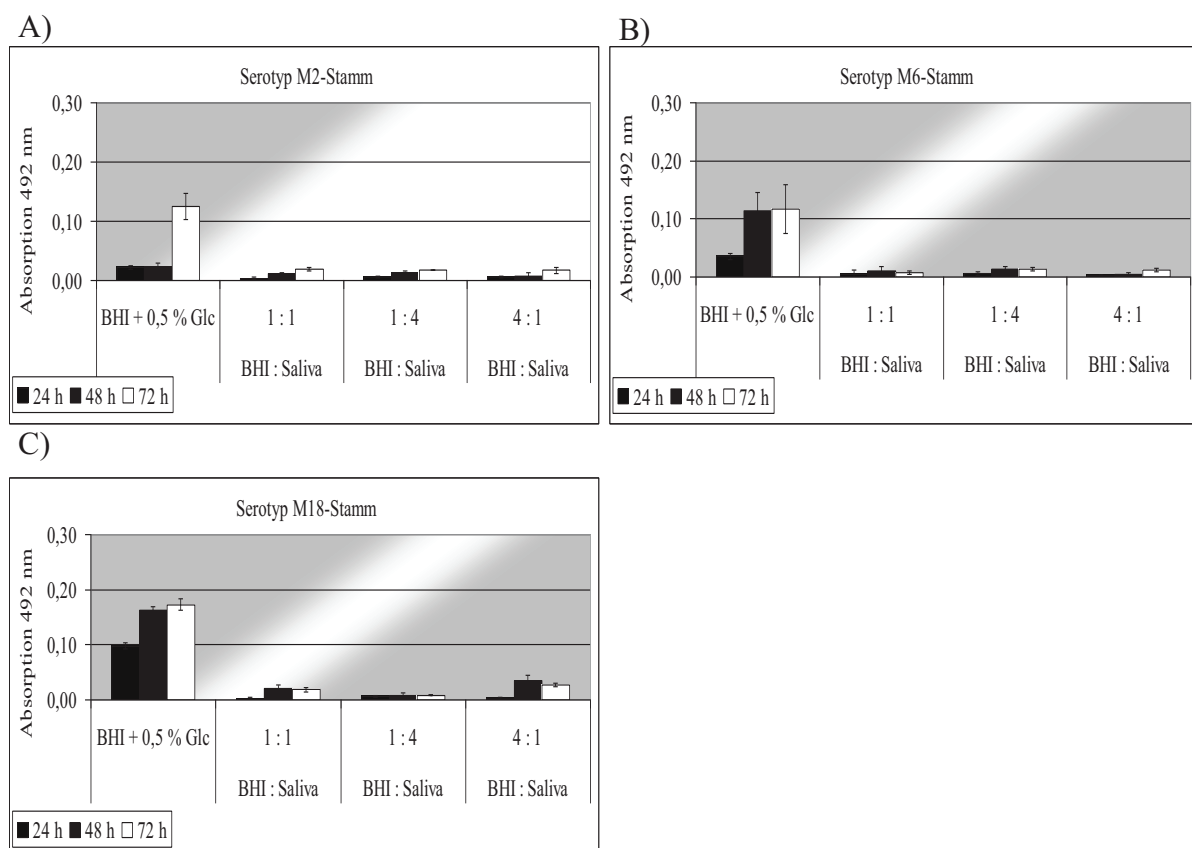
Parallel zu den Biofilmuntersuchungen erfolgten hier ebenfalls Messungen zum planktonischen Wachstumsverhalten aller drei Stämme, um eine etwaige Wachstumshemmung unter den oben aufgeführten Bedingungen für die Biofilmbildung auszuschließen (Kap. 7, Abb. A2). Die Messungen zeigten, dass das Wachstum von *S. pyogenes* in planktonischen Kulturen in allen drei Kulturmedien und durch Zugabe der Zucker nicht beeinflusst wurde. Aufgrund dessen kann davon ausgegangen werden, dass die Beobachtungen spezifisch für das Biofilmwachstum der Bakterien sind und durch das verwendete Medium induziert bzw. gehemmt wurde.



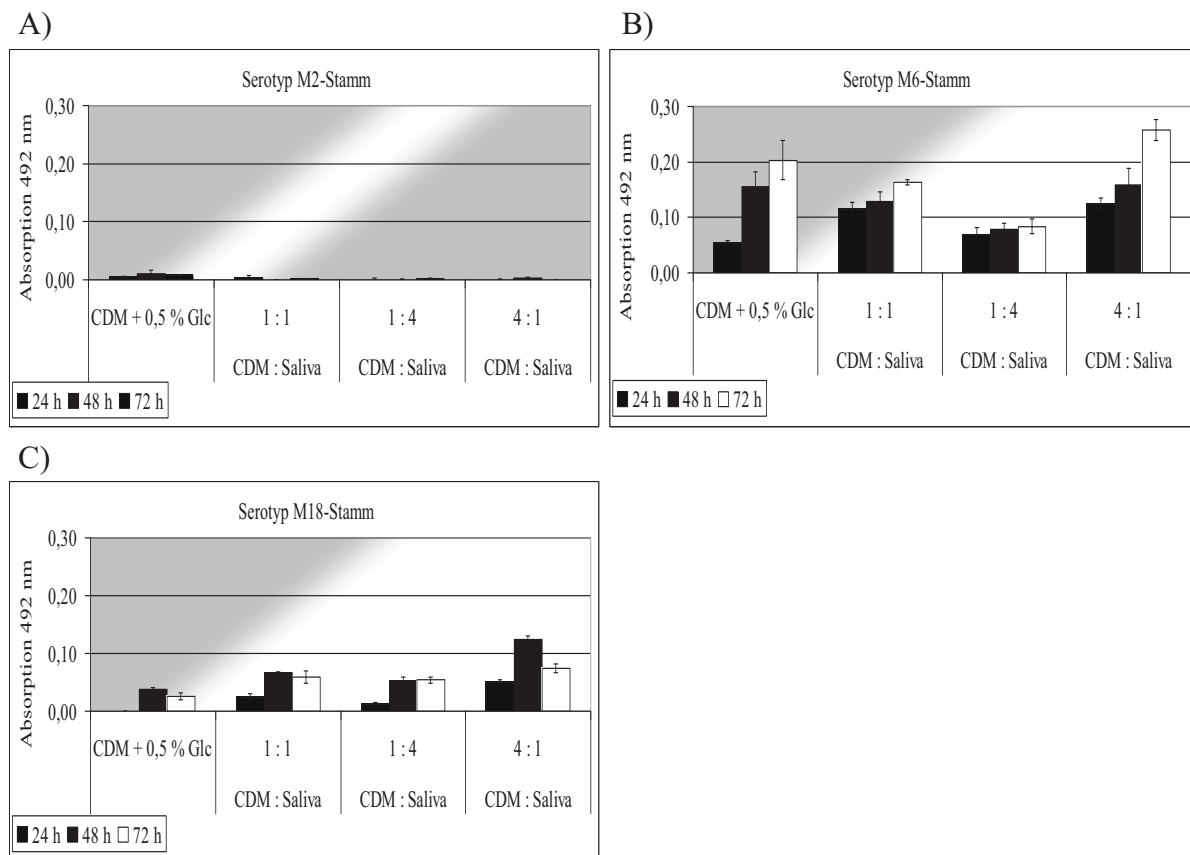
### 3.1.2.2 Einfluss von Saliva und Humanserum

Saliva, auch unter den Begriffen Mucus oder Speichel bekannt, spielt eine wichtige Rolle in der unspezifischen Abwehr gegen eindringende Bakterien. Speichel enthält eine Vielzahl von antimikrobiell wirksamen Substanzen. Dazu gehören eine Vielzahl von Enzymen, Immunglobuline und Mucine. Letztere sind große Glykoproteine, die einen maßgeblichen Anteil an der unspezifischen Abwehr auf der Schleimhautoberfläche übernehmen (8, 122, 226). In diesem Teil der Arbeit sollte die Wirkung von künstlich hergestelltem Speichel auf die Biofilmbildung verschiedener *S. pyogenes* Stämmen getestet werden.

Dafür wurde das BHI Medium mit 0,5 % Glukose sowie das Minimalmedium CDM mit 0,5 % Glukose mit künstlicher Saliva in drei verschiedenen Mischungsverhältnissen, 1:1 (1 Teil BHI + 1 Teil Zusatz), 1:4 (1 Teil BHI + 3 Teile Zusatz) sowie 4:1 (3 Teile BHI + 1 Teil Zusatz) getestet. In den nachfolgenden Abbildung 8 und 9 sind die Ergebnisse dargestellt.



**Abb. 8:** Einfluss von künstlicher Saliva auf die *S. pyogenes* Biofilmbildung in BHI Medium + 0,5 % Glukose. Die Biofilmmassebestimmung erfolgte jeweils alle 24 Stunden mittels Safraninfärbung mit anschließender Absorptionsmessung bei 492 nm. Dargestellt sind die Resultate für die Stämme der Serotypen M2 (1), M6 (2) und M18 (3). Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus mind. drei unabhängigen Versuchen.

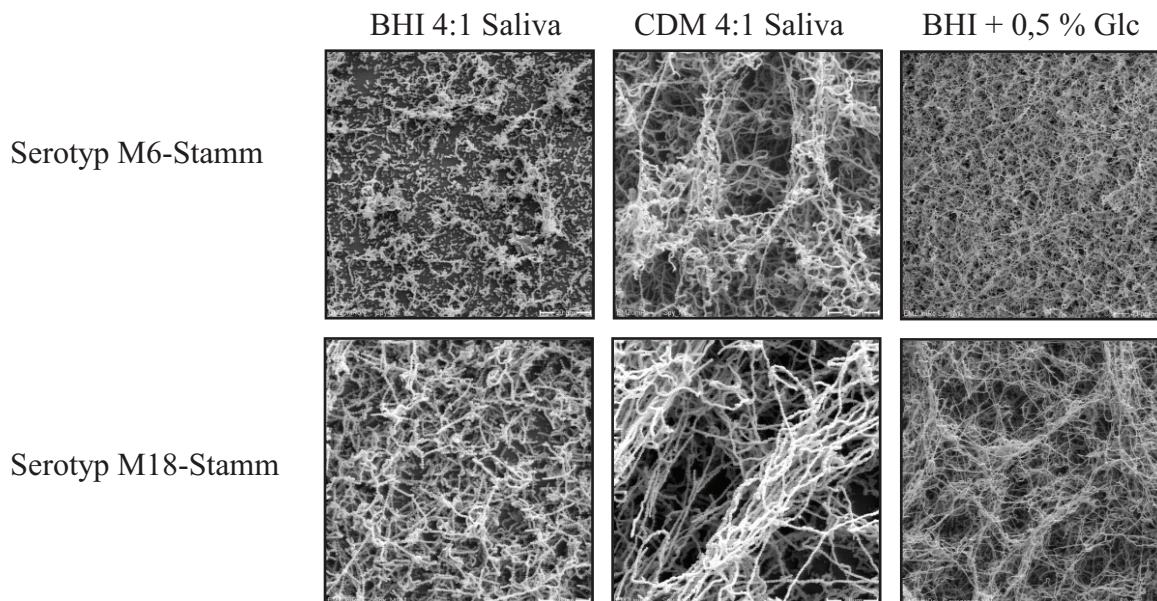


**Abb. 9:** Einfluss von künstlicher Saliva auf die Biofilmbildung von *S. pyogenes* in CDM Medium + 0,5 % Glukose. Die Bestimmung der Biofilmbildung erfolgte jeweils alle 24 Stunden mittels Safraninfärbung und anschließender Absorptionsmessung bei 492 nm. Dargestellt sind die Resultate für die Stämme der Serotypen M2 (1), M6 (2) und M18 (3). Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus mind. drei unabhängigen Versuchen.

In diesem Versuchsansatz zeigten alle drei Stämme im Vergleich zur Kontrolle bei allen getesteten Mischungsverhältnissen von Saliva in BHI Medium eine starke Reduktion der Biofilmmasse (Abb. 8, A-C). Der Serotyp M2-Stamm bildet in CDM keinen Biofilm (Abb. 9, A). Ein Zusatz von künstlicher Saliva änderte daran nichts. Bei den Stämmen der Serotypen M6 und M18 hat der Zusatz von Saliva zu CDM ebenfalls keinen anderen Effekt auf die im CDM sehr wohl vorhandene Biofilmmasse (Abb. 9, B und C).

Hier unterscheiden sich also die messbaren Effekte von Saliva in den beiden Kulturmedien BHI und CDM.

Trotz der nachweislichen Reduktion der Biofilmmasse im BHI Medium mit Saliva wuchsen die Stämme der Serotypen M6 und M18 laut REM-Daten noch in Zellzahlen, die mit der unbehandelten Kontrolle bzw. dem Wachstum in CDM-Saliva vergleichbar waren (Abb. 10).

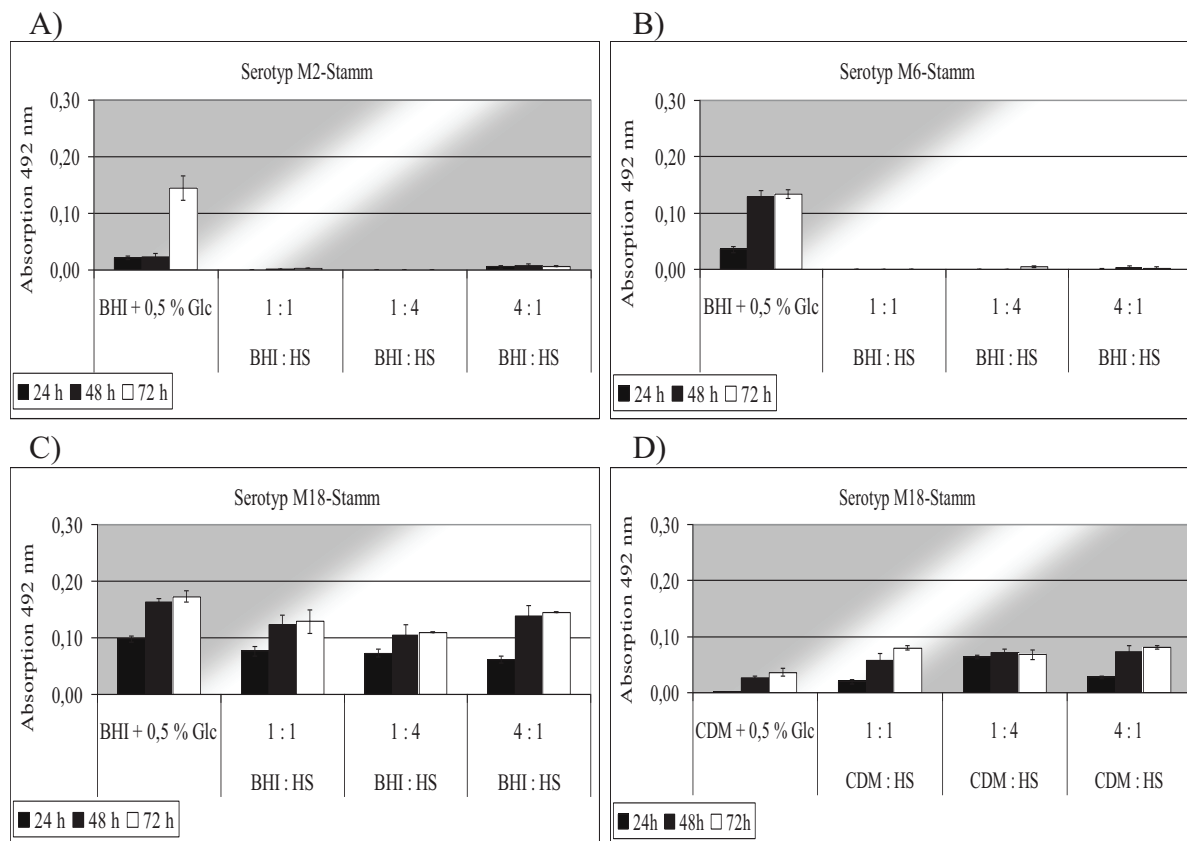


**Abb. 10:** Rasterelektronenmikroskopische Dokumentation des Saliva Einflusses auf die *S. pyogenes* Biofilmbildung. Gezeigt sind exemplarisch die Stämme der Serotypen M6 (1000-fach) und M18 (1000-fach) in BHI-Glc und Saliva im Verhältnis 4:1 sowie in CDM-Glc und Saliva 4:1 nach einer Inkubation von drei Tagen unter Standardbedingungen. Als Kontrollen wurden die Biofilmstrukturen von den Serotyp M6-Stamm und M18-Stamm in BHI-Glc ohne Zusatz (500-fach) gezeigt.

Der direkte Einfluss von Saliva auf wachsende *S. pyogenes* Stämme wurde zusätzlich mit planktonischen Zellen überprüft (Kap. 7, Abb. A3). Alle drei getesteten Stämme zeigten eine gegenüber der Kontrolle unveränderte Kinetiken und finale Zelldichten. Zusammengefasst zeigen die Resultate, dass Saliva auf die EPS-Bildung aller getesteten *S. pyogenes* Stämme bei Wachstum in BHI einen rezidivierenden Effekt hat.

Viele Faktoren der initialen unspezifischen und spezifischen Immunantwort spielen eine Rolle in der Abwehr von Krankheitserregern. Dazu gehören auch die von den B-Lymphozyten und im Blut bis zum Ort ihrer Wirkung transportierten Immunglobuline (Ig).

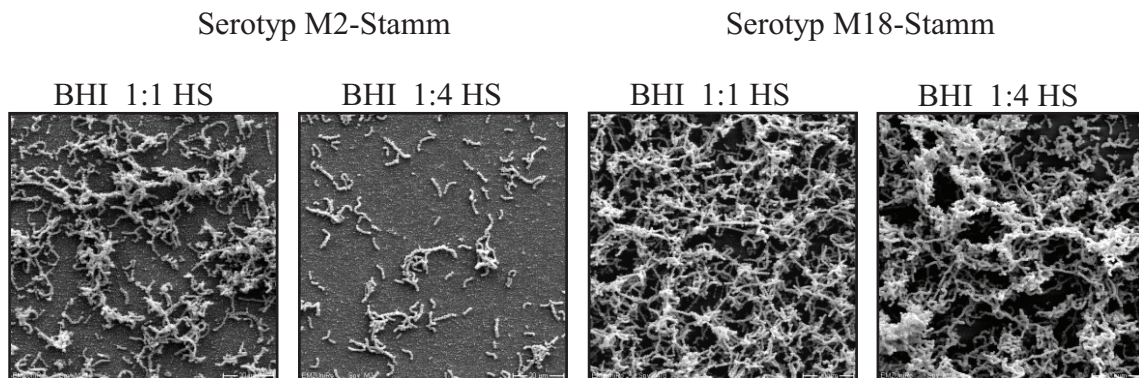
Zur Untersuchung der Wirkung von Immunglobulinen und weiterer löslicher Bestandteile der Wirtsabwehr auf die Biofilmbildung durch *S. pyogenes* wurde das Kulturmedium mit Humanserum versetzt. Der Ansatz erfolgte analog den Versuchen mit Saliva. Vor dem Gebrauch wurde das im Humanserum enthaltende Komplement bei 55 °C im Wasserbad für 20 min inaktiviert. Die Inkubation erfolgte jeweils für drei Tage mit anschließender Safraninmessung.



**Abb. 11:** Einfluss von Humanserum auf die *S. pyogenes* Biofilmbildung in BHI + 0,5 % Glukose (A-C) und CDM + 0,5 % Glukose (D). Dargestellt sind die quantitativen Biofilmmassebestimmungen mittels Safraninfärbung und anschließender Absorptionsmessung bei 492 nm jeweils nach 24-stündiger Inkubation über einen Zeitraum von drei Tagen. Dargestellt sind die Stämme der Serotypen M2 (A), M6 (B) und M18. Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus mind. drei unabhängigen Versuchen.

Wie in der Abbildung 11 zu erkennen ist, wurde durch den Serumzusatz bei zwei der getesteten *S. pyogenes* Stämmen die Fähigkeit zur Biofilmbildung inhibiert. Die Stämme der Serotypen M2 (A) und M6 (B) konnten sowohl in BHI als auch in CDM über den Beobachtungszeitraum von 72 Stunden keine nachweisbar adhären Biofilmstrukturen ausbilden. Demgegenüber zeigte der Serotyp M18-Stamm (C) in beiden getesteten Wachstumsmediem in Anwesenheit von Humanserum eine unveränderte Biofilmbildung.

In ergänzenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen (Abb. 12) konnten diese Ergebnisse bestätigt werden.



**Abb. 12:** Rasterelektronenmikroskopische Dokumentation des Einflusses von Humanserum auf die *S. pyogenes* Biofilmbildung. Gezeigt sind exemplarisch der Serotyp des M2-Stammes im 1:1 (A) und 1:4 (B) Mischungsverhältnis sowie M18-Stamm im 1:1 (C) und 1:4 (D) Mischungsverhältnis mit Humanserum nach einer Inkubation von drei Tagen in BHI + 0,5 % Glukose. Die Vergrößerung entspricht 1000-fach.

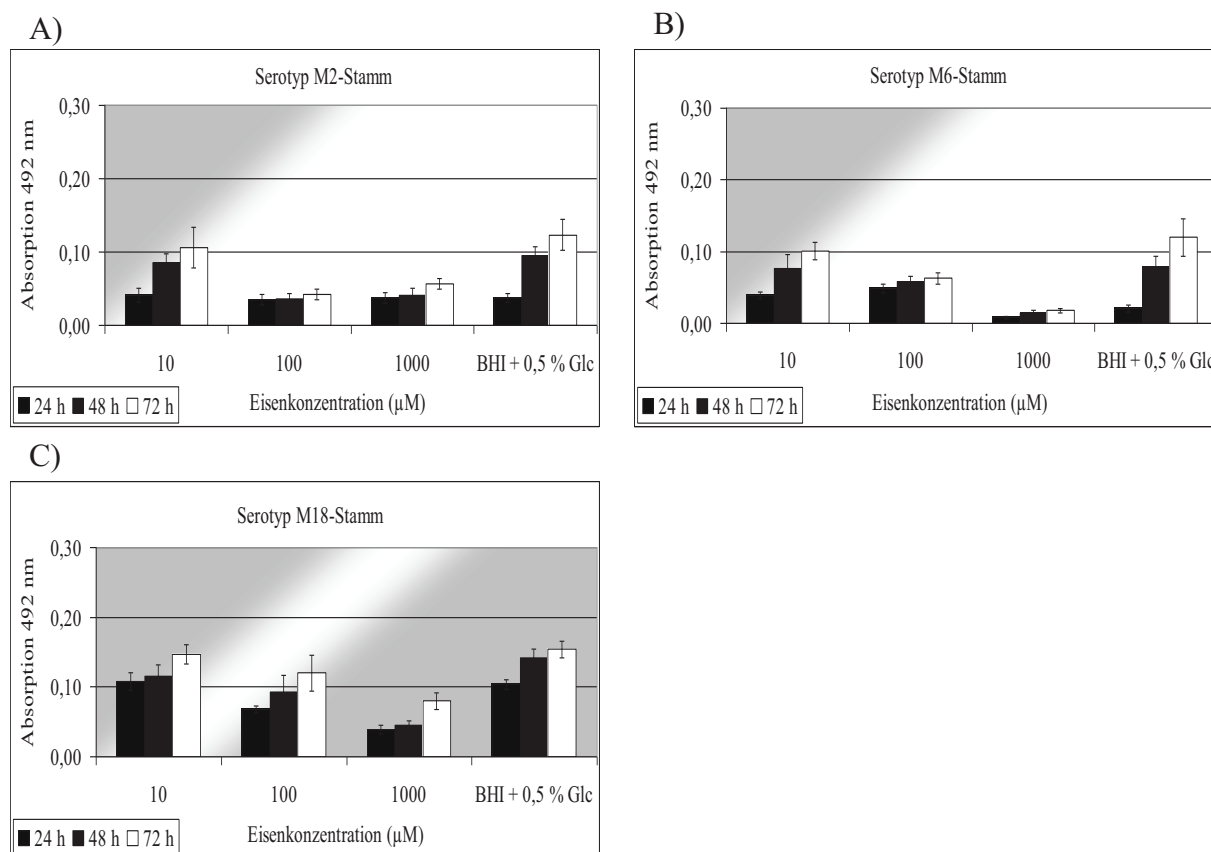
### 3.1.2.3 Einfluss von Eisen(III)chlorid

Frei verfügbares Eisen liegt im menschlichen Körper nur in sehr geringen Konzentrationen von etwa  $10^{-8}$   $\mu\text{M}$  vor. Diese Tatsache stellt einen limitierenden Faktor für das Wachstum pathogener Keime im Wirt da (177, 245). Deshalb müssen Bakterien über verschiedene Mechanismen Eisen den Wirtszellen entziehen.

Für *S. pyogenes* sind mehrere Regulations- und Transportsysteme beschrieben worden, die es ermöglichen, Eisenionen aus den Wirtszellen zu akkumulieren. Dabei sind Regulatoren involviert, die auch eine Rolle in der Biofilmbildung spielen können (70, 157, 198). Daher wurde in den folgenden Versuchen der Einfluss von Eisenionen auf die initiale Biofilmbildung von *S. pyogenes* Stämmen untersucht.

Für die *in vitro* Versuche wurden dem BHI Medium verschiedene Eisen(III)chlorid Konzentrationen zugegeben. Die Inkubation erfolgte über drei Tage mit täglicher Biofilmquantifizierung. Die Daten sind in der folgenden Abbildung 13 zusammenfassend gezeigt.



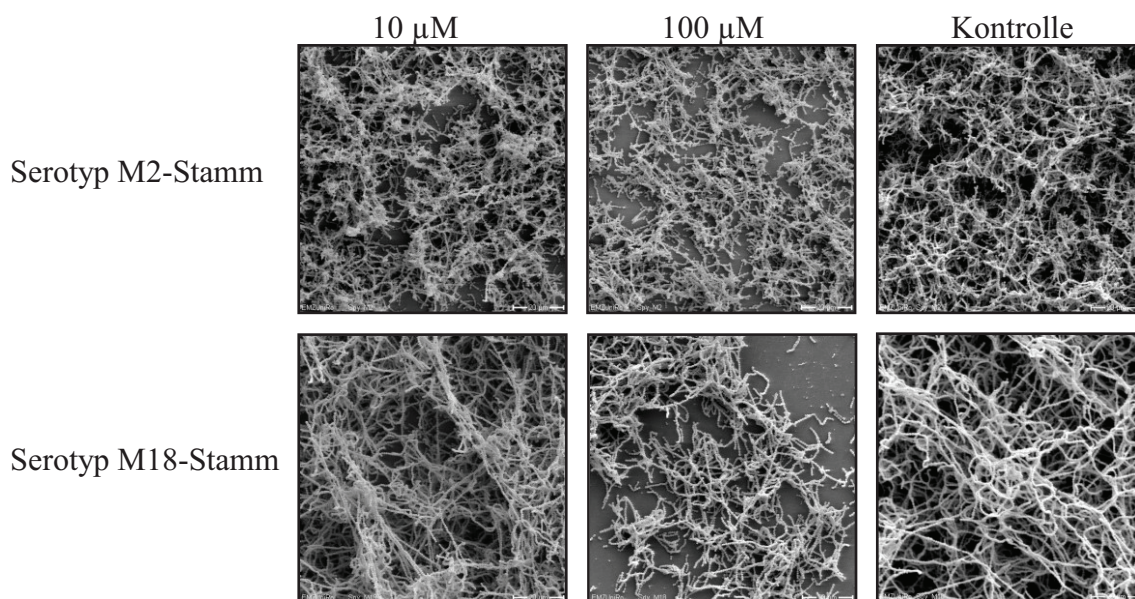


**Abb. 13:** Einfluss von Eisen(III)chlorid auf die *S. pyogenes* Biofilmbildung. Die Bestimmung der Daten erfolgte jeweils alle 24 Stunden bei 3-tägiger Inkubation. Die anschließende Färbung erfolgte mit Safranin und einer Absorptionsmessung bei 492 nm. Gezeigt sind die Ergebnisse für die Stämme der Serotypen M2 (A), M6 (B) und M18 (C). Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus mind. drei unabhängigen Versuchen.

Die Ergebnisse zeigten, dass Eisenionen ab einer Konzentration von 100 µM im Kulturmedium besonders auf die Biofilmreifung von den Stämmen der Serotypen M2 und M6 reduzierend wirkt. Das bedeutet, dass die Stämme nach 72 Stunden in Gegenwart dieser Eisenkonzentration eine geringe Biofilmmasse aufwiesen. Eisenkonzentrationen von 1 mM zeigten bereits nach 24-stündiger Inkubation einen negativen Effekt bei allen drei Serotyp-Stämmen. Nur bei einer Konzentration von 10 µM Eisen im Kulturmedium wurden Biofilmmassen mindestens im Ausmaß der Kontrollansätze gemessen.

Diese Resultate weisen darauf hin, dass die oben genannten Eisenkonzentrationen eine erkennbare Wirkung auf die Biofilmbildung und -reifung von *S. pyogenes* haben.

In der parallel durchgeführten REM-Untersuchung (Abb. 14) waren bei den hohen Eisenkonzentrationen die Zellzahlen im Biofilm vermindert, was zur im Safranin Test gemessenen reduzierten Biofilmmasse führt.



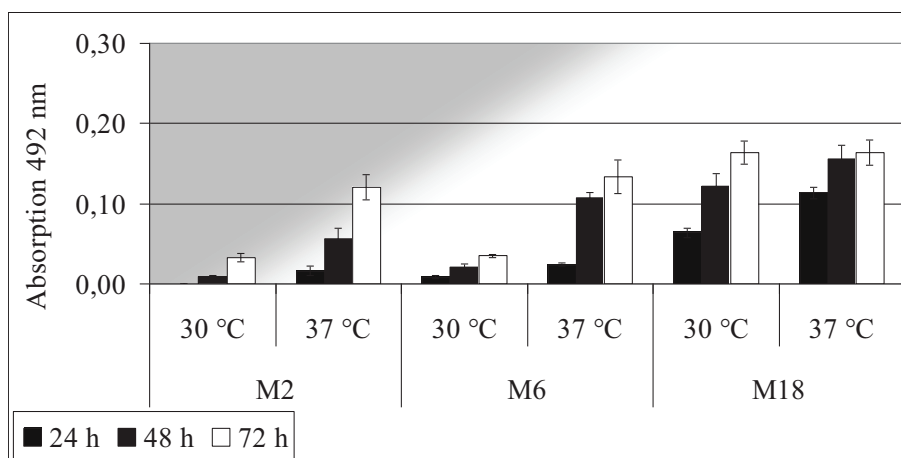
**Abb. 14:** Rasterelektronenmikroskopische Dokumentation des Einflusses von Eisen(III)chlorid auf die *S. pyogenes* Biofilmbildung. Gezeigt sind exemplarisch die Stämme der Serotypen M2 und M18 mit jeweils 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  Eisenzusatz sowie die Kontrollen ohne Zusatz von Eisen in BHI + 0,5 % Glukose nach einer Inkubation von drei Tagen. Die Vergrößerung entspricht 1000-fach.

Eine naheliegende Erklärung für das beobachtete Phänomen wäre eine allgemein toxische Wirkung höherer Eisenkonzentrationen auf das Bakterienwachstum. Deswegen wurden Wachstumskontrollen mit planktonischen Bakterien und ausgewählten Eisenkonzentrationen durchgeführt (Kap. 7, Abb. A4). Bei allen Versuchsansätzen wurde keine Wachstumshemmung beobachtet und somit ein generell hemmender Effekt auf das Bakterienwachstum ausgeschlossen.

### 3.1.2.4 Einfluss der Temperatur

*S. pyogenes* als humanpathogener Erreger ist in der Lage, sich während eines Infektionsprozesses an verschiedene Umgebungsbedingungen zu adaptieren. Auf der Hautoberfläche sind die Bakterien beispielsweise mit einem niedrigeren pH-Wert konfrontiert als im Blutstrom. Zudem können die Bakterien unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt sein. Während einer *S. pyogenes* Infektion kann es beispielsweise im Wirt zu Fieber kommen, d. h. die Bakterien müssen sich an Temperaturen über 37 °C anpassen. Im Gegensatz dazu sind bei Besiedlung bzw. Infektion der Haut oder tieferen Hautschichten die Temperaturen deutlich niedriger als 37 °C.

Ob ein Einfluss der Temperatur auf die *S. pyogenes* Biofilmbildung besteht, wurde im folgenden Experiment untersucht. Dazu wurden die Bakterien bei 30 °C und 37 °C über einen Zeitraum von drei Tagen inkubiert und die Biofilmentwicklung mit dem Safranin Test quantitativ ermittelt (Abb. 15).



**Abb. 15:** Einfluss der Temperatur auf die *S. pyogenes* Biofilmbildung. Die Bestimmung der Daten mittels Safraninfärbung mit anschließender Absorptionsmessung bei 492 nm erfolgte jeweils alle 24 Stunden über einen Zeitraum von drei Tagen. Gezeigt sind die Ergebnisse für die Stämme der Serotypen M2, M6 und M18 jeweils bei 30 °C und 37 °C. Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus mind. drei unabhängigen Versuchen.

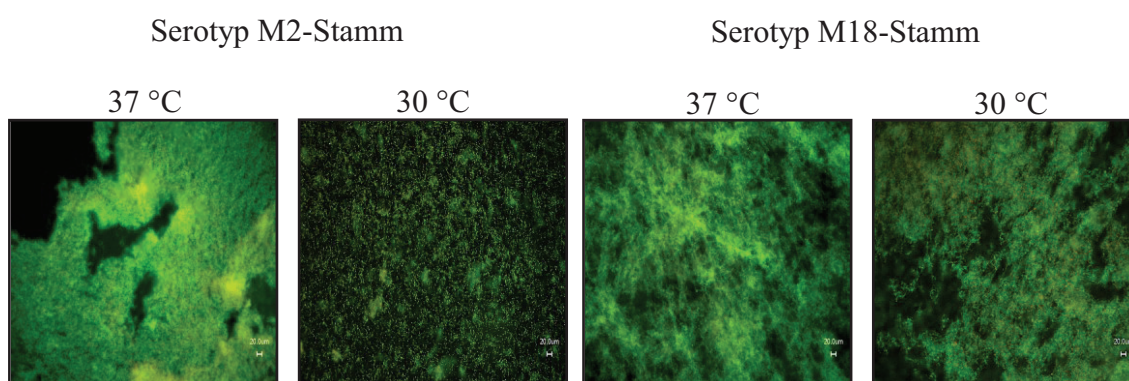
Bei Inkubation der Stämme der Serotypen M2 und M6 über drei Tage bei 30 °C zeigte sich eine deutliche Reduzierung der Mengenzunahme und endgültig erreichten Biofilmmasse im Vergleich zu den Werten bei 37 °C. Im Fall des Serotyp M18-Stammes waren die Effekte der niedrigen Inkubationstemperatur weit weniger stark ausgeprägt.

Damit eine Verringerung des bakteriellen Wachstums und eine damit verbundene Reduktion der Biofilmmasse ausgeschlossen werden konnte, wurden mit allen drei Stämmen Wachstumskinetiken planktonischer Bakterien unter den oben genannten Bedingungen erstellt



(Kap. 7, Abb. A5). Die Resultate zeigten, dass das Wachstum der Bakterien bei einer Temperatur von 30 °C über einen Zeitraum von wenigen Stunden weniger schnell vorangeht, trotzdem aber die gleiche endgültige Dichte erreicht wird. Das deutet daraufhin, dass die verminderte Fähigkeit der Biofilmbildung eine Reaktion auf die Erniedrigung der Umgebungstemperatur ist.

Zur Überprüfung der Vitalität von Zellen eignet sich die Fluoreszenzmikroskopie als Mittel der Wahl. In diesem Ansatz wurde untersucht, in wieweit die Vitalität der Biofilmzellen durch eine Erniedrigung der Außentemperatur beeinflusst wurde. Exemplarische Aufnahmen sind in der Abbildung 16 zusammengefasst. Wie zuvor war eine deutliche Reduktion der Biofilmmasse z. B. beim Serotyp M2-Stamm nach 72 Stunden Inkubation bei 30 °C zu beobachten. Eine kompakte und dichte Biofilmmasse wurde nur bei einer Temperatur von 37 °C erreicht. Dagegen zeigt der Biofilm des Serotyp M18-Stammes bei beiden Temperaturen keine relevanten Strukturunterschiede. Unabhängig davon konnte bei beiden getesteten Stämmen keine starken Veränderungen der Zellvitalität beobachtet werden, da der Anteil grün (=lebend) und rot (= tot) fluoreszierender Zellen im Biofilmverband annähernd gleich blieb.



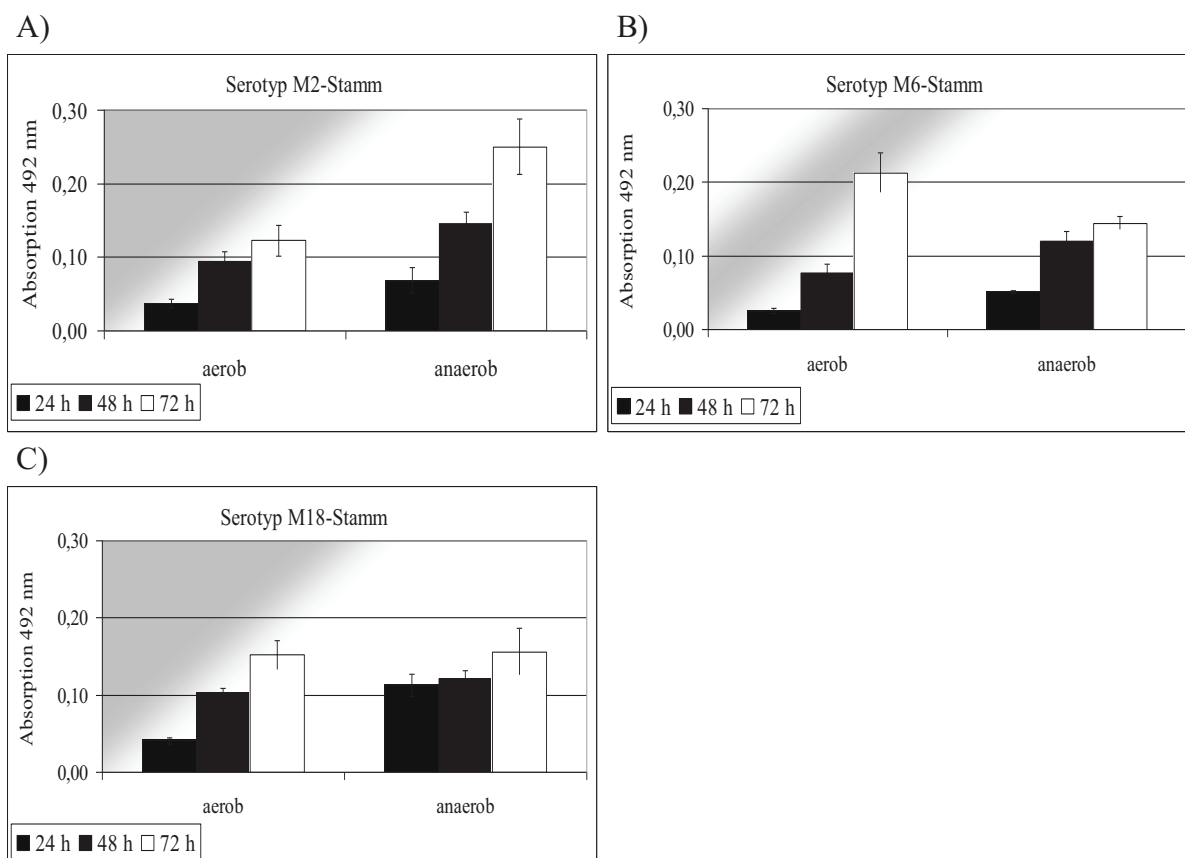
**Abb. 16:** Fluoreszenzaufnahmen von Biofilmen ausgewählter *S. pyogenes* Serotyp-Stämme bei verschiedenen Temperaturen. Für die Bilddokumentation wurden die drei Tage alten Biofilmzellen mit einem Lebend/Tot Farbstoff gefärbt. Exemplarisch sind die Fluoreszenzaufnahmen vom Serotyp M2-Stamm und M18-Stamm bei 37 °C und 30 °C dargestellt. Die Vergrößerung beträgt 10-fach.

### 3.1.2.5 Verfügbarkeit von Sauerstoff

*S. pyogenes* ist ein aerotolerantes Bakterium mit anaeroben Stoffwechsel. Es besitzt keine Katalase und unter aeroben Wachstumsbedingungen kommt es zu einer oxidativen Stressreaktion in der Zelle. Für den Abbau von entstehenden Sauerstoffradikalen müssen daher Entgiftungssysteme in der Bakterienzelle aktiviert werden (93, 94, 153).

Bei Infektionen tieferer Gewebeschichten, die schwere Hautinfektionen wie nekrotisierende Fasciitis zur Folge haben können, wird *S. pyogenes* mit einem geringen Sauerstoffangebot konfrontiert. Je nach Infektionsort bzw. -verlauf sind unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen vorzufinden. Auf der Hautoberfläche finden sich eher atmosphärische Bedingungen. Hingegen liegen bei *S. pyogenes* Infektionen tieferer Gewebeschichten ein mikroaerophiles/anaerobes Klima vor (86).

Inwiefern sich das Sauerstoffangebot auf die Entwicklung von Biofilmstrukturen von *S. pyogenes* auswirkte, wurde in den folgenden Untersuchungen analysiert (Abb. 17).



**Abb. 17:** Anaerobe und aerobe Kultivierung von *S. pyogenes* Biofilmen. In BHI + 0,5 % Glukose wurden die Bakterien über drei Tage unter den genannten Bedingungen inkubiert und in 24 Stunden-Intervallen erfolgte die quantitative Biofilmbestimmung mittels Safranin Test. Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus mind. drei unabhängigen Versuchen.

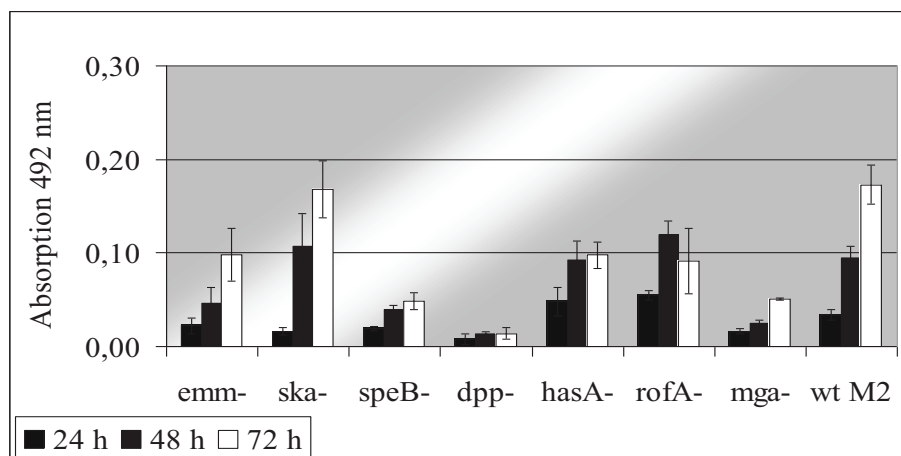
Die Resultate zeigten ein Serotyp-spezifisches Biofilmverhalten von *S. pyogenes*. Die Stämme der Serotypen M2 und M18 wiesen bereits nach 24 Stunden sowie nach drei Tagen unter Sauerstoffmangel in BHI + 0,5 % Glukose eine Erhöhung der Biofilmmasse auf (Abb. 17, A und C). Bei dem Serotyp M6-Stamm (Abb. 17, B) führte die anaerobe Kultivierung in BHI mit Glukose zu einem tendenziell eher verringerten Biofilmwachstum.

Um nachzuweisen, inwieweit das Sauerstoffangebot sich auf das Wachstum planktonischer Zellen auswirkt, wurden in einem parallelen Ansatz Wachstumskinetiken der aeroben und anaeroben Bedingungen durchgeführt (Kap. 7, Abb. A6). Alle drei getesteten Stämme wuchsen unter diesen atmosphärischen Bedingungen nahezu gleichartig.

### **3.1.3 Die Biofilmbildung verschiedener *S. pyogenes* Insertionsmutanten**

*S. pyogenes* ist ein humanpathogener Erreger, dessen Virulenzpotential durch eine Vielzahl an Virulenzfaktoren gekennzeichnet ist (Kap. 1.4.3). Diese ermöglichen je nach dem Muster ihrer Expression ein Besiedeln des Wirtsorganismus, die Adhärenz an und Internalisierung in die Wirtszellen sowie eine Zellschädigung. Das Muster der Ausprägung der Virulenzeigenschaften wird über eine Vielzahl von Regulationsmechanismen gesteuert. Für einige Bakterienarten wurden von anderen Arbeitsgruppen auch Zusammenhänge zwischen der Expression von Virulenzgenen und der Biofilmbildung beschrieben (32, 67, 146).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden exemplarisch verschiedene Virulenzgen-Mutanten des Serotyp M2-Stammes auf ihre Fähigkeit zur Biofilmbildung untersucht. Dazu wurden die Stämme in 96-Well Mikrotiterplatten kultiviert und mittels Safranin Test (Kap. 2.2.5) die Biofilmmasse quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse wurden in der Abbildung 18 zusammengefasst.



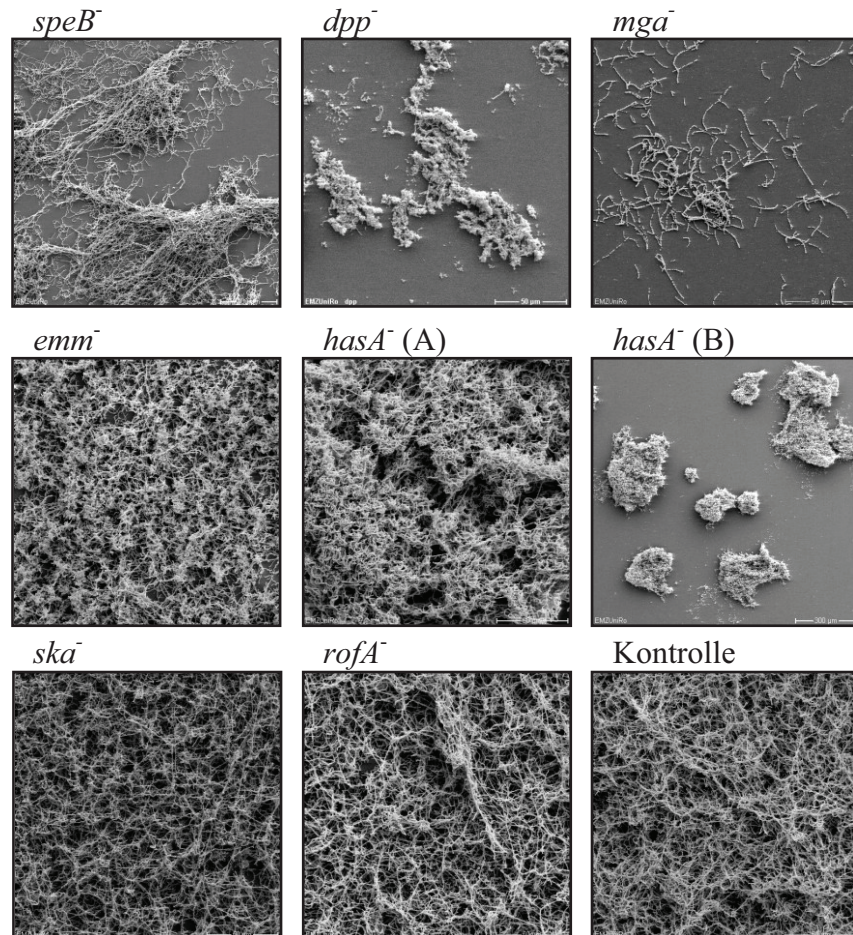
**Abb. 18:** Quantitative Biofilmbestimmung von Insertionsmutanten des Serotyp M2-Stammes. Dargestellt sind die Ergebnisse der Biofilmquantifikationen mittels Safranin Test. Die Färbung erfolgte in 24 Stunden-Intervallen mit anschließender Absorptionsmessung bei 492 nm. Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus mind. drei unabhängigen Versuchen.

Für die Untersuchungen wurden folgende *S. pyogenes* Virulenzgenmutationen betrachtet:

- *emm*<sup>-</sup>: M-Protein
- *ska*<sup>-</sup>: Streptokinase
- *speB*<sup>-</sup>: Cysteinprotease (Exotoxin B)
- *dpp*<sup>-</sup>: Dipeptidpermease
- *hasA*<sup>-</sup>: Kapselprotein Hyaluronidase
- *rofA*<sup>-</sup>: globaler Positivregulator (RALP Familie)
- *mga*<sup>-</sup>: globaler Positivregulator

Die Untersuchungen ergaben ein differentes Bild der *in vitro* Biofilmbildung bei den getesteten Mutanten. Wie in der Abbildung 18 zu erkennen ist, haben praktisch alle Mutationen (bis auf die *ska*-Mutante) einen mehr oder minder deutlich negativen Einfluß auf die Entwicklung der Biofilmmasse. Dieser Effekt war für die Mutanten der Dipeptidpermease (*dpp*-Gen), der Cysteinprotease (*speB*-Gen) sowie des Positivregulators Mga (*mga*-Gen) besonders ausgeprägt. Für Mutanten der *emm*-, *hasA*- und *rofA*-Gene waren die Effekte weniger dramatisch. Allerdings wurden besondere Muster erkennbar. Die *hasA*-Mutante zeigt nach zunächst normaler Biofilmentwicklung ab 24 Stunden keine Massenzunahme mehr. Die *rofA*-Mutante entwickelte über 48 Stunden einen normalen Biofilm. Danach verringerte sich aber die Biofilmmasse wieder.

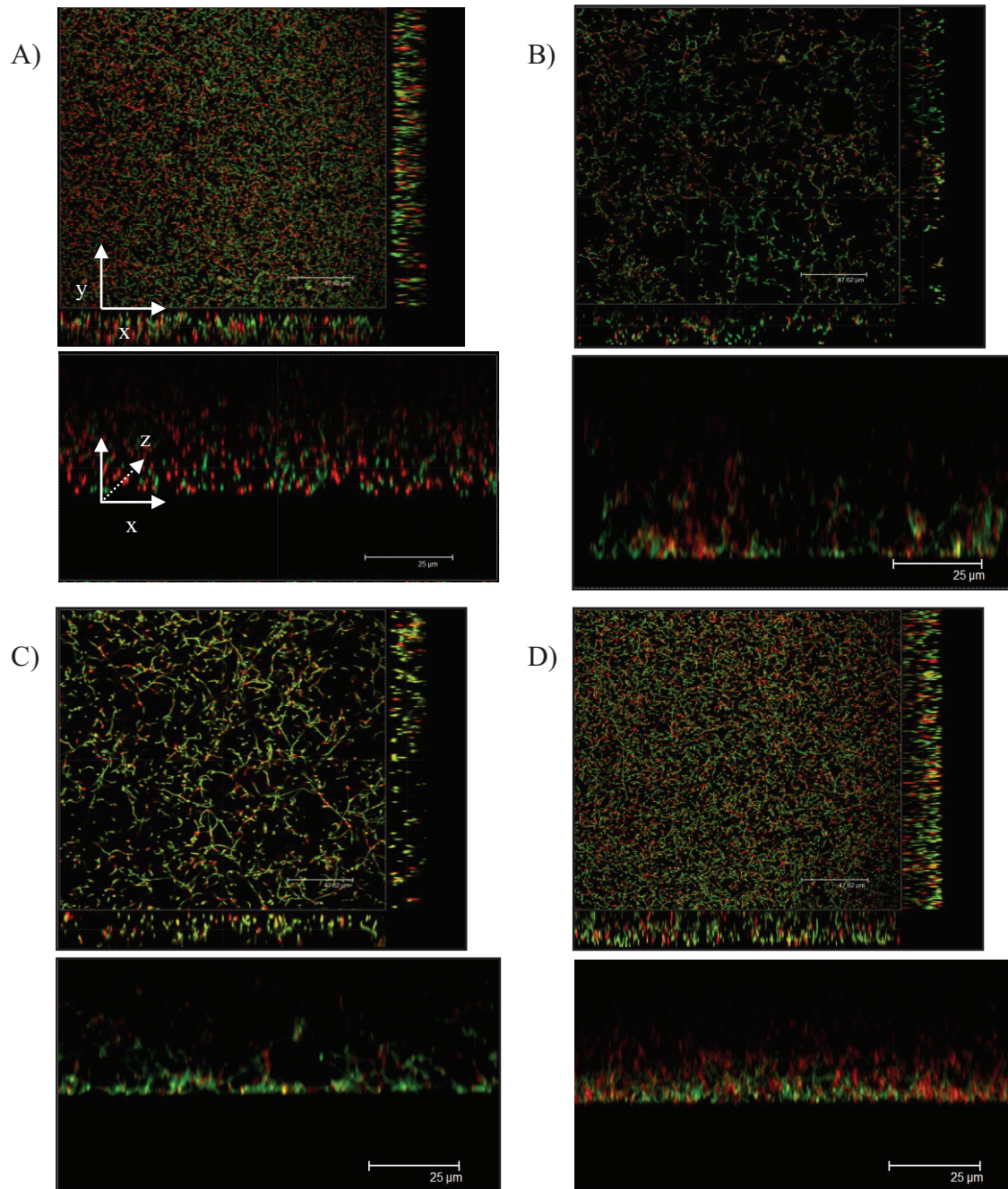
Um einen Einblick in strukturelle Besonderheiten dieser Biofilme zu erhalten, wurden diese über einen Zeitraum von drei Tagen unter Standardbedingungen inkubiert und anschließend mit der Rasterelektronenmikroskopie (Abb. 19) sowie mit dem Lebend/Tot Farbstoff (Kap. 2.2.3.1.) für die Konfokale Laserscanning Mikroskopie angefärbt (Abb. 20).



**Abb. 19:** Rasterelektronenmikroskopische Dokumentation der Biofilme nach drei Tagen Inkubation von Insertionsmutanten des *S. pyogenes* Serotyp M2-Stammes. Gezeigt sind die *speB*- (200-fach), die *dpp*- und *mga*-Mutante, Biofilmstrukturen von der *emm*- und *has*-und (B =72-fach) Mutante sowie Bilder der *ska*- und *rofA*-Mutante. Der Wildtyp diente als Referenzwert. Die Vergrößerung entspricht 500-fach, soweit nichts anderes angegeben ist.

In Übereinstimmung mit den Safraninmessungen waren die Zellzahlen und Schichtdicken der *dpp*-, *speB*- und *mga*-Mutanten im Biofilm stark vermindert. Das Biofilmbild der anderen Mutanten in der Rasterelektronenmikroskopie ließen keine klaren Unterschiede zu dem der Wildtypbakterien erkennen. Damit können die Meßergebnisse nach Safraninfärbung auf eine veränderte EPS-Produktion dieser Mutanten hinweisen.





**Abb. 20:** CLSM-Aufnahmen von ausgewählten Biofilmstrukturen von *S. pyogenes* Mutanten nach drei Tagen Inkubation in BHI-Glc. Für die Bilddokumentation wurden die Biofilmzellen mit einem Lebend/Tot Farbstoff gefärbt. Exemplarisch sind die Fluoreszenzaufnahmen vom Wildtyp (A), der *hasA*- (B), *dpp*- (C) sowie *rofA*- (D) Mutante des Serotyp M2-Stammes gezeigt. In der obigen Reihe sind ausgewählte Serienschritte des Biofilms („section“, xz Ausrichtung) dargestellt, die unteren Abbildungen zeigen jeweils in Einzelaufnahmen die toten (rot) und lebenden (grün) Zellen sowie den Overlay beider Farbstoffe. Die gezeigten Bildausschnitte sind aus einer Sammlung von seriellen xz Serienschritte der Biofilmschichten. Die Größe des gezeigten Areals beträgt 1024 x 512  $\mu\text{m}$ . Vergrößerung 60-fach.

Weitgehend vergleichbare Ergebnisse wurden im Rahmen der Untersuchungen zum Biofilmverhalten mit Hilfe der CLSM-Methode erhalten (Abb. 20). In diesem Teil der Arbeit bot sich die Konfokale Laserscanning Methode als sehr geeignet an, da nicht nur die Vitalitäten der Zellen, sondern auch einzelne Ebenen innerhalb des Biofilmverbundes dargestellt werden konnten (Kap. 2.2.6.2). Sowohl glich der Biofilm der *rofA*-Mutante (D) weitgehend dem des Wildtyps (A). Beide zeigten gleichmäßig strukturierte und dichte Biofilmschichten sowie eine ausgeglichene Verteilung von lebenden (grün) und toten (rot) Zellen. Eine ganz andere Biofilmmorphologie wies die *hasA*-Mutante auf (B). Wie schon bei den REM-Aufnahmen zu erkennen war, konnten nur einzelne Biofilmfetzen nachgewiesen werden. Mit der konfokalen Mikroskopie wurden große Zwischenräume und eine damit verbundene lockere Biofilmarchitektur nachgewiesen. Demgegenüber konnte für die *dpp*-Mutante eine relativ dichte aber wenig erhabene Biofilmzellschicht detektiert werden.

## 3.2 Quantifizierung der extrazellulären polymeren Matrix (EPS)

### 3.2.1 Wirkung von DNase I und Proteinase K

Dieser Abschnitt umfasst Untersuchungen der extrazellulären Matrix (EPS) von *S. pyogenes* Biofilmen. Bisher ist über deren Zusammensetzung wenig bekannt. Allerdings zeigten Untersuchungen sowohl von Gram-negativen (z. B. Pseudomonaden, Neisserien) als auch von Gram-positiven Spezies (z. B. Staphylokokken, Enterokokken), dass die Biofilmmatrix ein hoch komplexes Netzwerk darstellt (79). Das Zusammenspiel aller Komponenten der EPS prägt den gesamten Biofilm in seiner Struktur und Stabilität. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass die Matrix extrazelluläre DNA (eDNA), Strukturproteine, Enzyme und eine Vielzahl an Zuckermolekülen enthält (217, 247, 254). Der Abbau von eDNA oder anderen Strukturkomponenten verursachte in Biofilmen eine Destabilisierung der Gesamtstruktur (159, 178, 205).

In den nachfolgenden Untersuchungen wurde versucht, die Rolle von eDNA sowie unbekannter Strukturproteine für die *S. pyogenes* Biofilmreifung und -stabilität herauszuarbeiten.

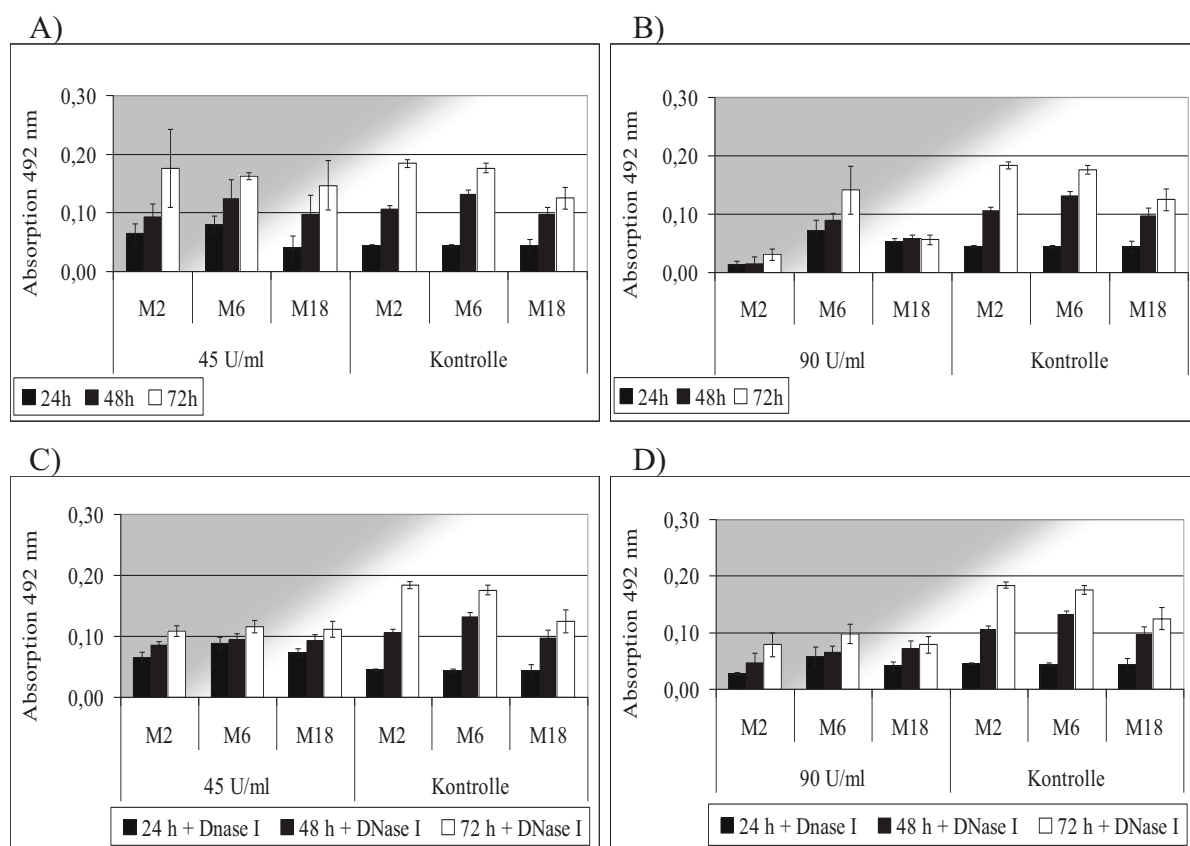
#### 3.2.1.1 Biofilmquantifizierung nach DNase I-Behandlung

Es wurde beschrieben, dass die Entwicklung, Reifung und Stabilität von bakteriellen Biofilmen durch Komponenten der extrazellulären Matrix maßgeblich wird. Dazu zählt die extrazelluläre DNA (eDNA), der u. a. eine Rolle in der Zellkommunikation (Quorum sensing, QS) zugesprochen wird und die für die Biofilmstabilität pathogener Erreger essentiell ist (247). Es wird vermutet, dass durch das Vorhandensein von DNasen die Biofilmentwicklung und -stabilität vermindert bzw. vollständig unterdrückt werden kann. Um den Einfluss der eDNA für *S. pyogenes* Biofilme bewerten zu können, wurden diese mit dem Enzym DNase I (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) behandelt. DNase I ist eine Endonuklease, die doppel- und einzelsträngige DNA Strukturen in kleinere Fragmente (Oligo- und Mononukleotide) schneidet.



Im Rahmen der Arbeit wurde der Effekt von Dnase I auf die initiale Biofilmentstehung sowie bereits vorhandenen Biofilmstrukturen mit zwei verschiedenen DNase I-Konzentrationen (45 U/ml und 90 U/ml) untersucht (Kap. 2.2.8). Als Kontrollen dienten Biofilme, die lediglich mit dem dazugehörigen DNase I-Puffer inkubiert wurden.

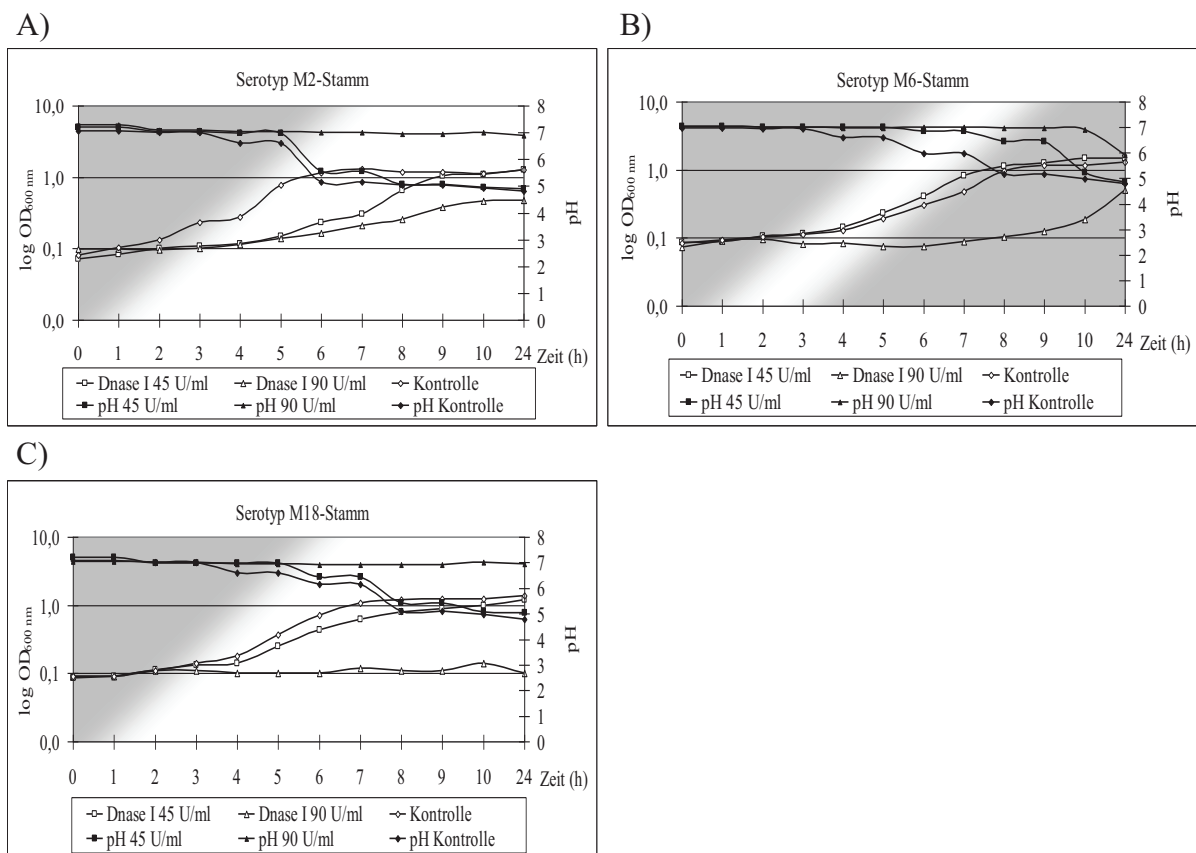
Für den Safranin Test wurden die Biofilme in 96-Well Mikrotiterplatten über einen Zeitraum von drei Tagen inkubiert und einzelne Vertiefungen im Verlauf der Ansätze nach jeweils 24 Stunden mit der entsprechenden DNase I-Konzentration versetzt. Nach einstündiger Inkubation wurden die Vertiefungen gewaschen und gefärbt (Kap. 2.2.5). Der Einfluss der DNase I auf die Biofilmbildung und bereits gebildeter Biofilmmassen unterschiedlicher Entwicklungsphasen ist in der Abbildung 21 zusammengefasst.



**Abb. 21:** Wirkung von DNase I auf die initiale Biofilmentstehung (A und B) und auf prä-inkubierte Biofilmmassen (C und D) von *S. pyogenes* Stämmen der Serotypen M2, M6 und M18. Die Bestimmung der Daten erfolgte mittels Safraninfärbung mit anschließender Absorptionsmessung bei 492 nm über einen Zeitraum von insgesamt drei Tagen. Der Einfluss von DNase I auf die initiale Biofilmbildung wurde jeweils in 24 Stunden-Intervallen und der Effekt auf prä-inkubierte Biofilmmassen nach einstündiger Inkubation mit dem Enzym mittels Safranin Test bestimmt. Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus mind. drei unabhängigen Versuchen.

Alle drei Stämme zeigten in Gegenwart von DNase I im Vergleich zu den Kontrollen eine Veränderung in der quantifizierten Biofilmmassebildung (Abb. 21). Des Weiteren waren jeweils konzentrationsabhängige Effekte des Enzyms sowohl während der initialen Biofilmbildung als auch auf prä-inkubierte Biofilme zu erkennen. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass eDNA eine wichtige Funktion in der Entwicklung und Stabilität von *S. pyogenes* Biofilmen ausübt.

Zur Überprüfung eines schädigenden Effekts von DNase I auf die planktonischen *S. pyogenes* Zellen wurden für alle getesteten Versuchsansätze Wachstumskinetiken mit paralleler pH-Wert Bestimmung durchgeführt und sind in der Abbildung 22 dargestellt.



**Abb. 22:** Wachstumsverlauf von *S. pyogenes* in Gegenwart von DNase I. Dargestellt sind die Ergebnisse des Wachstumverhaltens von Stämmen der Serotypen M2 (A), M6 (B) und M18 (C). Als Kontrollen wurden die Kulturmedien mit dem jeweiligen DNase I-Puffer inkubiert. Parallel zur OD<sub>600nm</sub> Messung erfolgte die pH-Wert Bestimmung des Kulturmediums.

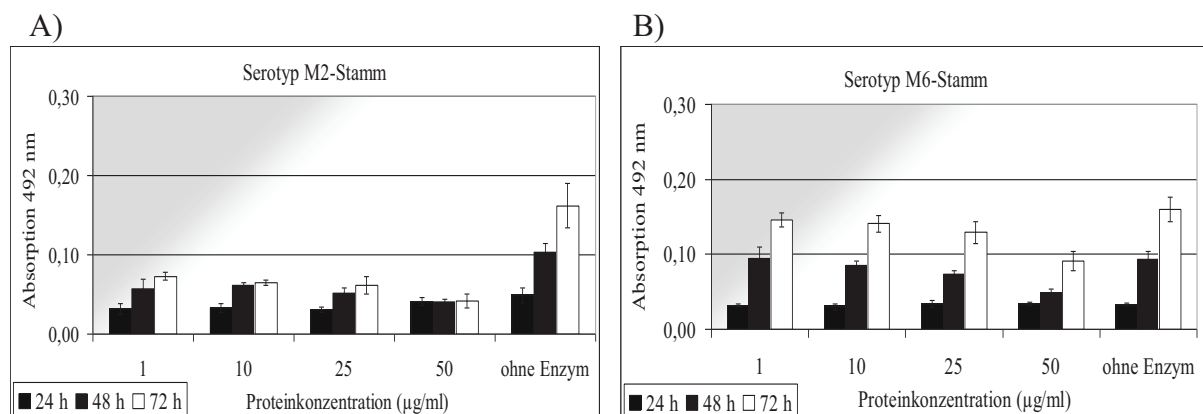
Alle drei Stämme zeigten ein normales Wachstumsverhalten in Gegenwart der niedrigen DNase I-Konzentration (45 U/ml). Parallel zur exponentiellen Wachstumsphase sinkt der pH-Wert in allen Kulturen aufgrund des homofermentativen Stoffwechsels von *S. pyogenes* auf einen Endwert von 4,8 bis 4,9.

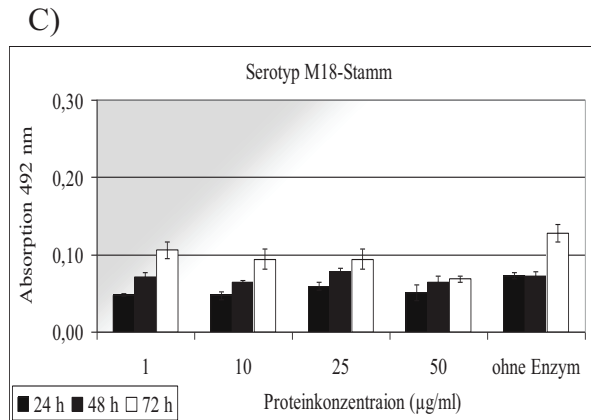
Dagegen wirkt die höhere DNase I-Konzentration von 90 U/ml inhibierend auf das *S. pyogenes* Wachstum. In Folge sank der pH-Wert dieser Ansätze nur auf Werte von 5,9 bis 6,9. Die exponentielle Wachstumsphase erreichten die Stämme der Serotypen M2 und M6 deutlich verlangsamt nach 24-stündiger Inkubation und auch die finale Keimdichte blieb unterhalb des Normalwertes. Beim Serotyp M18-Stamm wurde in Anwesenheit von 90 U/ml DNase I kein Wachstum detektiert. Der DNase I-Puffer war nicht für die beobachteten Effekte verantwortlich, da die entsprechenden Kontrollkulturen aller drei Stämme normale Wachstumskinetiken aufwiesen. Demnach muss die Hemmung des Wachstums auf das Enzym zurückzuführen sein.

### 3.2.1.2 Biofilmquantifizierung nach Proteinase K-Behandlung

Neben der extrazellulären DNA kann die Biofilmmatrix auch eine Vielzahl an verschiedenen Strukturproteinen enthalten. Für erste qualitative Aussagen über das potentielle Vorhandensein von Proteinen in der Matrix von *S. pyogenes* Biofilmen wurde das Enzym Proteinase K (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) gewählt. Da keine in- oder externe Untersuchungen hinsichtlich des Proteingehalts und der Proteinkonzentration in der Matrix vorliegen, wurden vier verschiedene Proteinase K-Konzentrationen gewählt.

Die Biofilme wurden über einen Zeitraum von 24 h, 48 h bzw. 72 h inkubiert und anschließend für eine Stunde bei 37 °C mit Proteinase K behandelt (Kap. 2.2.8). Danach erfolgte die Bestimmung der Biofilmmasse mit Hilfe des Safranin Tests (Kap. 2.2.5.). Alle Ergebnisse sind in der Abbildung 23 zusammengefasst.





**Abb. 23:** Safranin Test von Proteinase K-behandelten *S. pyogenes* Biofilmstrukturen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Biofilmquantifikationen von den Stämmen der Serotypen M2 (A), M6 (B) und M18 (C). Die Färbung erfolgte jeweils nach einstündiger Inkubation des Enzyms auf die Biofilmstrukturen mit anschließender Absorptionsmessung bei 492 nm. Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus mind. drei unabhängigen Versuchen.

Wieder zeigten sich Serotyp-spezifische Unterschiede in der Enzymempfindlichkeit. Im Vergleich zum Kontrollbiofilm (ohne Enzym) zeigte nur der Serotyp M2-Stamm (Abb. 23, A) eine Reduktion in der Biofilmmasse nach der Behandlung, bei frischen wie auch bei drei Tage alten Biofilmstrukturen. Diese Reduktion wurde schon bei der niedrigsten Enzymkonzentration von 1 µg/ml beobachtet und änderte sich mit steigender Enzymkonzentration nur unwesentlich.

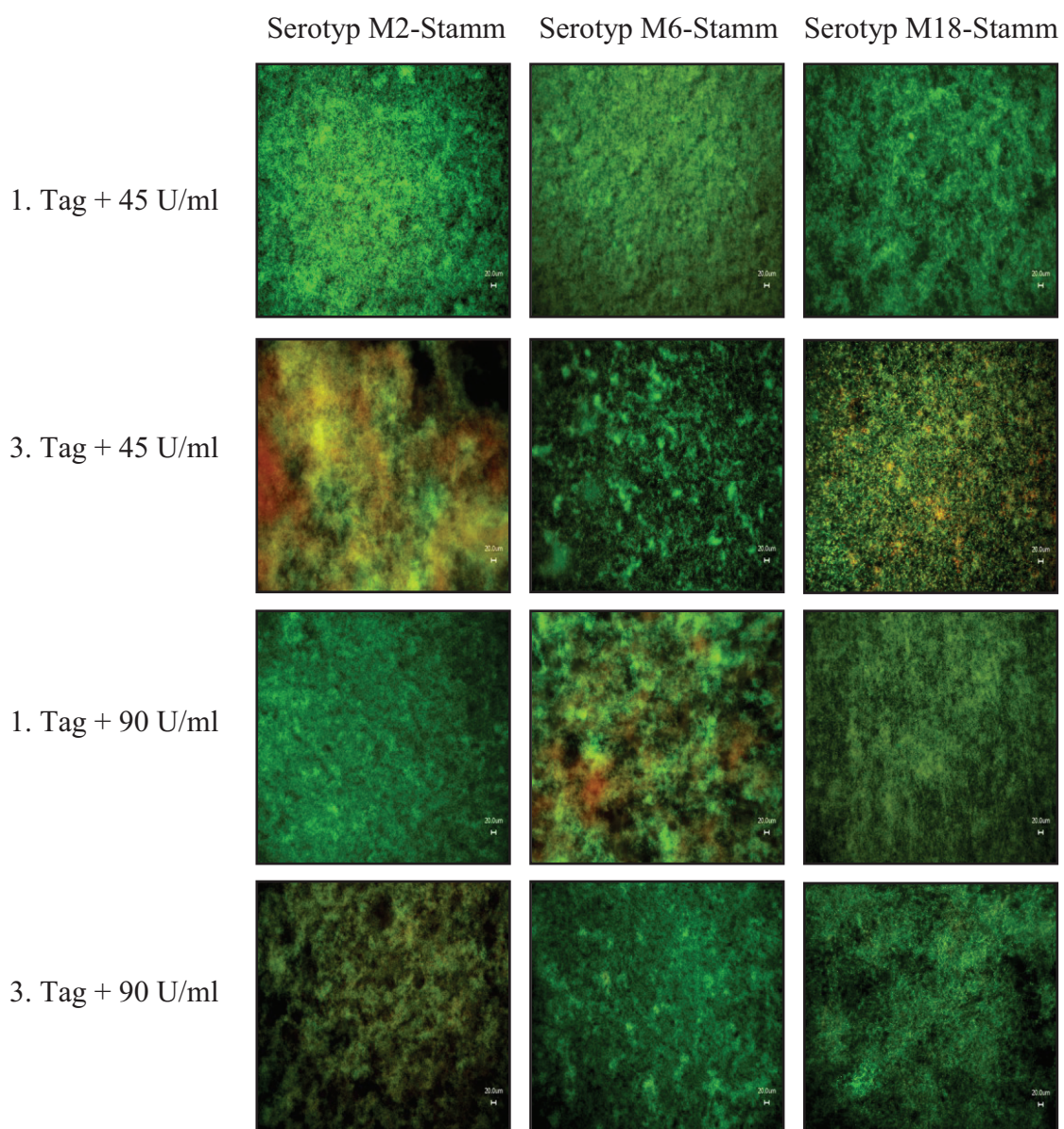
Demgegenüber stehen die Ergebnisse von den Stämmen der Serotypen M6 und M18 (Abb. 23 B und C). Hier zeigten sich bei niedrigeren Proteinase K-Konzentrationen keine Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Biofilmmassen. Eine geringe Reduktion der Biofilmmassen konnte mit Zunahme der Proteinkonzentration beobachtet werden (Abb. 23, B). Lediglich die eingesetzte Höchstkonzentration von 50 µg/ml Enzym führte bei beiden Stämmen zu einer Degradation der Biofilmmasse maßgeblich nur bei den älteren Biofilmen.

Im Rahmen der weiterführenden Untersuchungen wurde die Wirkung von Proteinase K auf das Wachstumsverhalten planktonischer Zellen untersucht, um mögliche inhibierende Effekte auszuschließen (Kap. 7, Abb. A7). Solche wurden nicht festgestellt, daher sind die beobachteten Effekte des Enzyms für Biofilm-organisierte Bakterien spezifisch.

### 3.2.2 Mikroskopische Dokumentation

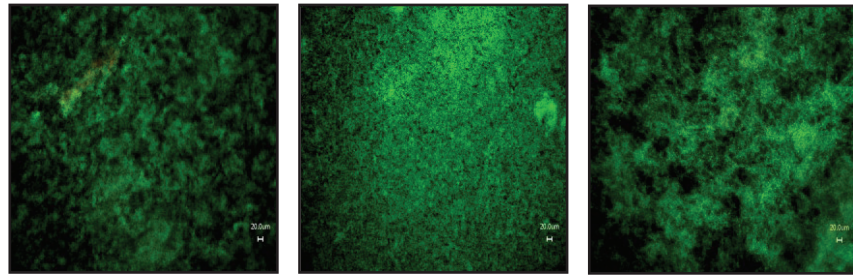
Die Visualisierung der Biofilmvitalität und -stabilität nach der DNase I- und Proteinase K-Behandlung erfolgte mit der Lebend/Tot Färbung (Kap. 2.2.3.1).

In der folgenden Abbildung 24 konnte exemplarisch gezeigt werden, dass DNase I einen Effekt auf prä-inkubierte Biofilmstrukturen ausübt. Nach der Behandlung wiesen alle Biofilme im Vergleich zu den Kontrollen eine Veränderung hinsichtlich ihrer Vitalität auf. Insbesondere ältere Biofilmstrukturen wiesen einen deutlich höheren Anteil an toten Zellen (rote Fluoreszenz) im Vergleich zur Kontrolle auf. Diese Resultate implizieren, dass die eDNA eine Rolle für die Vitalität der Bakterienzellen in älteren Biofilmen spielt.



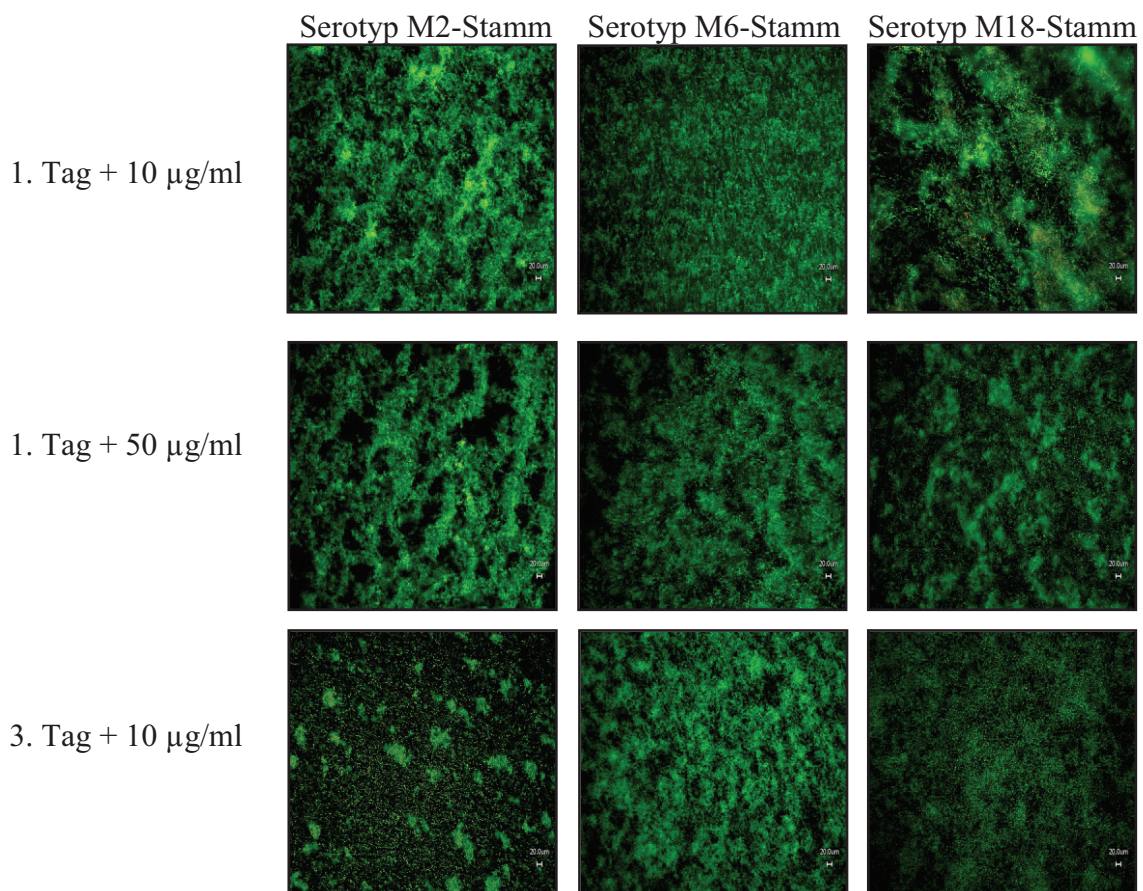


## 3. Tag Kontrolle

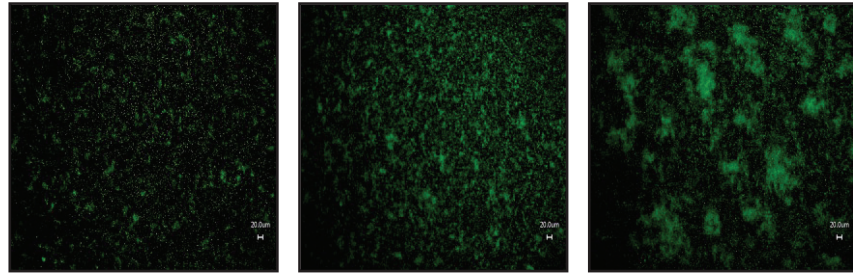


**Abb. 24:** Fluoreszenzaufnahmen von DNase I-behandelten *S. pyogenes* Biofilmen. Für die Bilddokumentation wurden die Biofilmzellen mit einem Lebend/Tot Farbstoff gefärbt. Exemplarisch sind die Fluoreszenzaufnahmen von den Serotypen der Stämme M2, M6 und M18 dargestellt. Es werden jeweils ein und drei Tage alte Biofilmstrukturen mit 45 U/ml bzw. 90 U/ml Enzym behandelt. Die drei Tage alten Kontrollen wurden mit DNase I-Puffer inkubiert. Die Vergrößerung entspricht 10-fach.

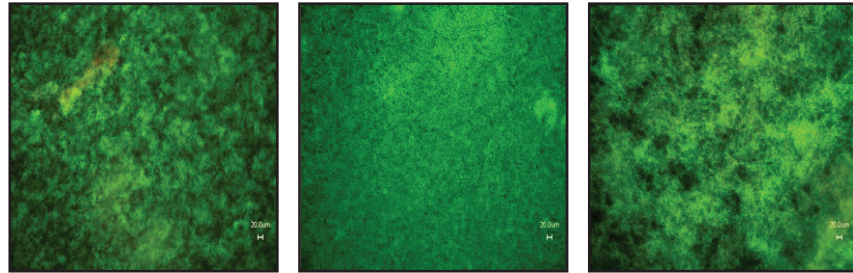
Bei Behandlung der prä-inkubierten Biofilme mit der größeren DNase I-Enzymmenge traten Serotyp-spezifische Effekte zutage. So nahm die Vitalität der Zellen vom Serotyp M6-Stamm auch schon in jungen Biofilmstrukturen ab.



3. Tag + 50 µg/ml



3. Tag Kontrolle



**Abb. 25:** Fluoreszenzaufnahmen von Proteinase K-behandelten *S. pyogenes* Biofilmen. Für die Bilddokumentation wurden die Biofilmzellen mit einem Lebend/Tot Farbstoff gefärbt. Exemplarisch sind die Fluoreszenzaufnahmen von Stämmen der Serotypen M2, M6 und M18 dargestellt. Es werden jeweils ein und Tage alte Biofilmstrukturen gezeigt, die mit 10 µg/ml und 50 µg/ml Proteinase K behandelt wurden. Die drei Tage alten Kontrollen wurden mit dem jeweiligen Proteinase K Puffer inkubiert. Die Vergrößerung entspricht 10-fach.

Bei entsprechenden Untersuchungen zur Wirkung von Proteinase K auf *S. pyogenes* Biofilmstrukturen zeigten sich in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 25) unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Vitalität und Biofilmstabilität.

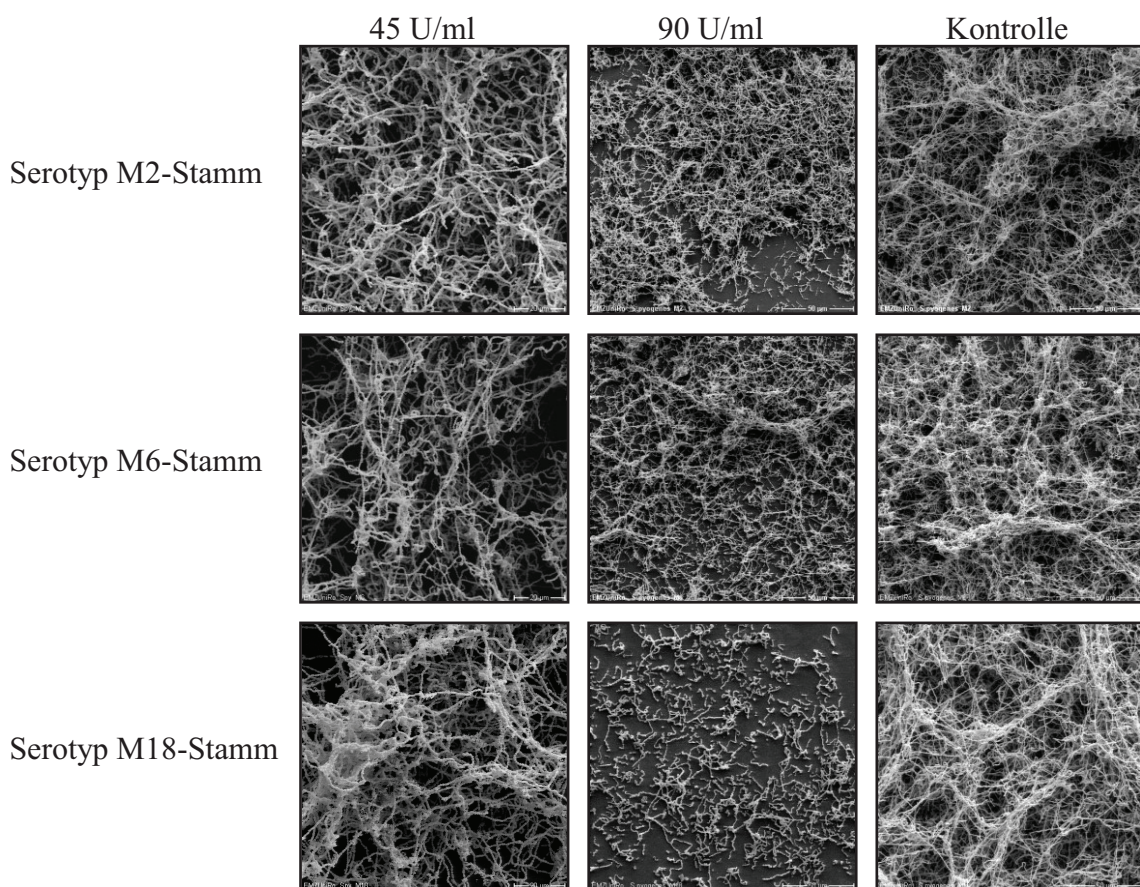
Eine deutliche Abnahme der Biofilmmasse war bei allen Stämmen und den exemplarisch ausgewählten Enzymkonzentrationen von 10 µg/ml und 50 µg/ml im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollbiofilmen detektierbar. Die Reduktion war gleichermaßen bei jüngeren und älteren Biofilmen zu beobachten. Zudem wurde ein konzentrationsabhängiger Effekt der Proteinase K festgestellt. Die Biofilme des Serotyp M18-Stammes wurden von der hohen Enzymkonzentration beeinflusst. Dies weist darauf hin, dass Proteine in der *S. pyogenes* Serotyp M18-Stamm Biofilm-Matrix vorhanden sind, die nicht durch Proteinase K verdaut werden können.

Anhand des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Vitalität der Biofilmzellen durch die Behandlung mit Proteinase K nicht so stark beeinflusst wurde wie durch DNase I (Abb. 21). Dies wurde durch vergleichsweise größere Mengen an grün fluoreszierenden, also lebenden Biofilmzellen deutlich.



Zur Abrundung der Aussage wurden die Biofilme nach der DNase I- und Proteinase K-Behandlung auch mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht (Kap. 2.2.6.3).

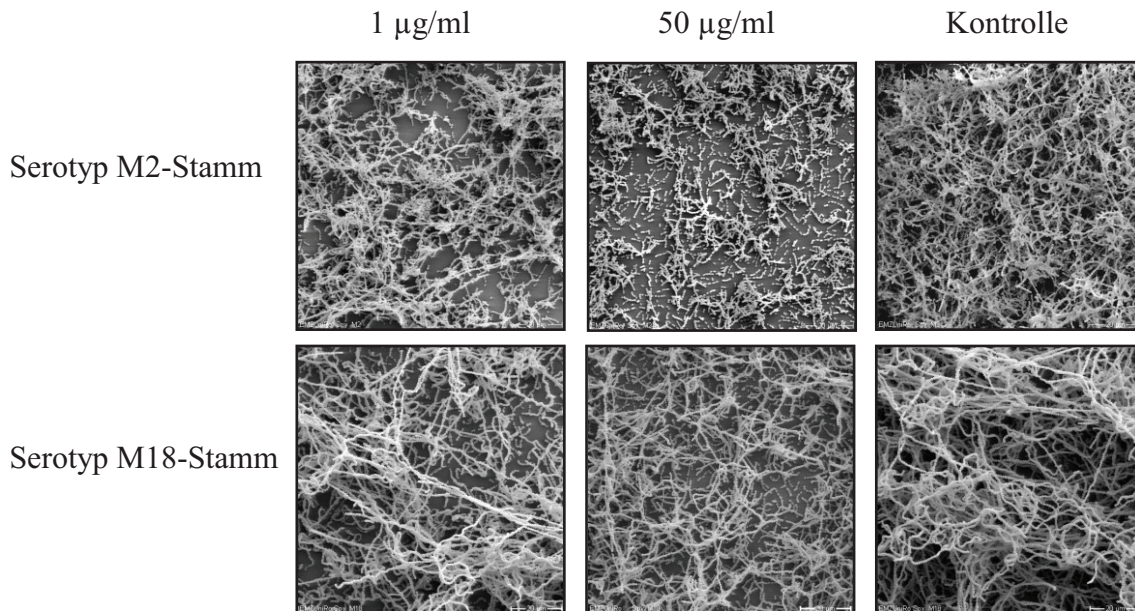
Nachfolgend sind die REM-Aufnahmen gezeigt, die eine Rolle von eDNA für die Bildung und Reifung von *S. pyogenes* Biofilmen nahelegen (Abb. 26). Die Ausbildung von Biofilmstrukturen nach drei Tagen Inkubation wurde bei allen drei Stämmen bei simultaner Zugabe von 45 U/ml DNase I kaum beeinflusst, hingegen höhere Enzymkonzentrationen von 90 U/ml die Biofilmentwicklung stark verringerte. Insbesondere beim Serotyp M18-Stamm war eine deutliche Reduktion der Biofilmbildung zu verzeichnen, da nur vereinzelt kleine Mikrokolonien beobachtet wurden und das verminderte Biofilmzellwachstum auch auf eine inhibierende Wirkung des Enzyms (Abb. 21) zurückzuführen sein kann.



**Abb. 26:** Rasterelektronenmikroskopische Dokumentation der *S. pyogenes* Biofilmbildung in DNase I-haltigem Medium. Gezeigt sind exemplarisch drei Tage alte Biofilmstrukturen von Stämmen der Serotypen M2, M6 und M18, die in Kultur mit 45 U/ml (1000-fach) bzw. 90 U/ml (500-fach) Enzym inkubiert wurden. Die Kontrollen wurden mit dem jeweiligen Enzympuffer inkubiert. Die Vergrößerung beträgt jeweils 500-fach (90 U/ml) bzw. 1000-fach (45 U/ml und Kontrollen).



Weitgehend kongruent mit den vorher beschriebenen Ergebnissen mit Proteinase K waren beim Serotyp M2-Stamm schon bei geringen Enzymkonzentrationen eine Auflockerung der Biofilmstruktur zu beobachten (Abb. 27), während beim Serotyp M18-Stamm dies erst bei der höheren Enzymkonzentration eintrat.



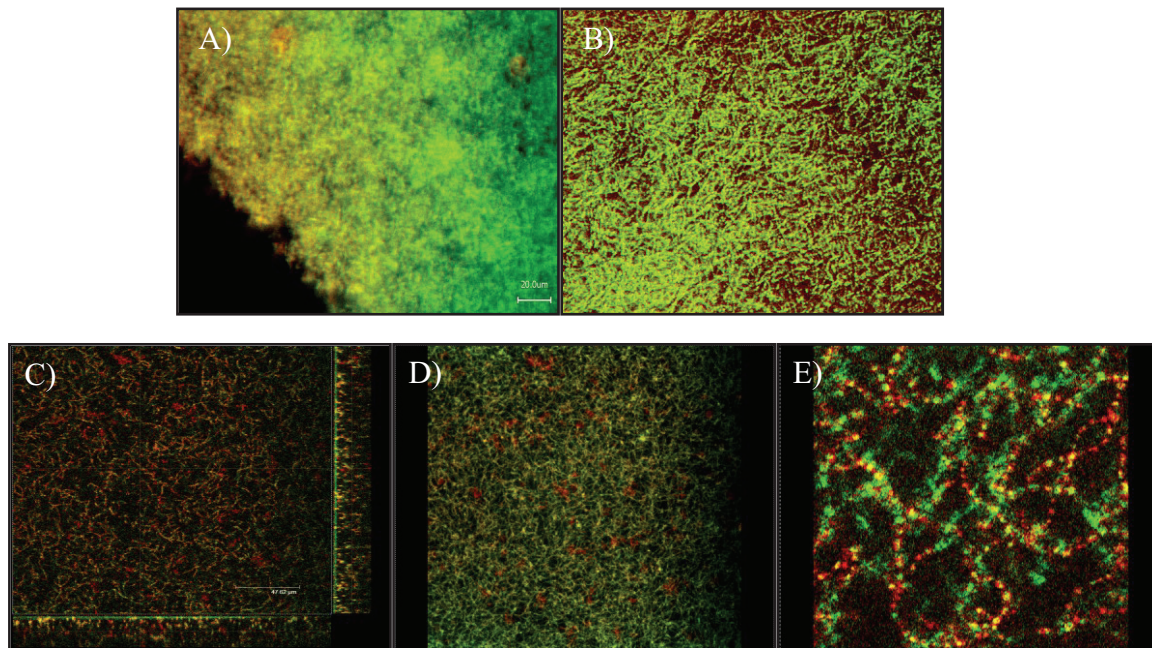
**Abb. 27:** Rasterelektronenmikroskopische Dokumentation von Proteinase K-behandelten *S. pyogenes* Biofilmstrukturen. Gezeigt sind exemplarisch drei Tage alte Biofilmstrukturen von Stämmen der Serotypen M2 und M18, behandelt mit 1  $\mu\text{g/ml}$  und 50  $\mu\text{g/ml}$  Enzym. Die Kontrollen wurden mit dem jeweiligen Enzympuffer inkubiert. Die Vergrößerung entspricht 1000-fach.

### 3.2.3 Visualisierung von EPS-Strukturen

Die EPS als heterogene Substanz ist maßgeblich für die biologischen, physikalischen und chemischen Prozesse innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft „Biofilm“ verantwortlich. Sie stellt das „Rückgrat“ des Biofilms dar und ist u. a. für die Stabilität sowie den diffusen Nährstofftransport über Poren bzw. Kanäle innerhalb des Biofilms verantwortlich. Die extrazellulären Bestandteile der Biofilmmatrix zeichnen sich durch eine hohe Komplexität aus und werden hauptsächlich durch die Bakterien selbst produziert. Eine Vielzahl von Farbstoffen zur Färbung von Komponenten der Biofilmmatrix wurde bereits beschrieben und in ihren Eigenschaften charakterisiert (255). Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet (Tab. 6), mit denen potentiell vorhandene extrazelluläre Matrixkomponenten von *S. pyogenes* Biofilmen visuell dargestellt werden sollten (Kap. 2.2.3.2). Die Ergebnisse der Dokumentation sind in der Abbildung 28 exemplarisch dargestellt.

**Tab. 6:** Verwendete Lektine für die Visualisierung von EPS-Strukturen

Lektin Bezeichnung	Konjugat	Bindungseigenschaften
Concanavalin A (ConA)	Texas Red	$\alpha$ -Mannopyranosyl, $\alpha$ -Glucopyranosyl
Wheat Germ Agglutinin (WGA)	Alexa Fluor 647	N-acetylglucosamin (NAcGlc) <sub>2</sub> N-acetylneuraminsäure (Sialinsäure)
Phytohämagglutinin-L (PHA)	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Oligosaccharide



**Abb. 28:** Fluoreszenzaufnahmen von EPS-Strukturen ausgewählter *S. pyogenes* Stämme der Serotypen M2 und M18 mittels CLSM (C, D und E) und konventioneller Fluoreszenzmikroskopie (A, B). Exemplarisch dargestellt sind der Serotyp M2-Stamm (A, B und E) sowie M18-Stamm (C und D) nach 72 h Inkubation unter Standardbedingungen. Folgende EPS-Markierungsfarbstoffe wurden verwendet: GAS AK Alexa Fluor® 488 + ConA Texas Red (A), Syto 9 + WGA Alexa Fluor® 647 (B), GAS AK-FITC + ConA Texas Red (C und D), GAS AK Alexa Fluor® 647 + PHA Alexa Fluor® 488. Gezeigt sind Bildausschnitte aus xyz Serienschnitten. Die Größe des gezeigten Areals beträgt 1024 x 1024 µm. Der Vergrößerungsfaktor der konventionellen Mikroskopiebilder ist 40-(A) bzw. 10-fach (B), der CLSM-Bilder 60-fach mit dem Zoom-Faktor 1 (C, D) und 4 (E).

Die Visualisierung der EPS-Strukturen in *S. pyogenes* Biofilmen erfolgte mit Hilfe verschiedener Farbstoffe (Kap. 2.2.3.2).

Da für diese Spezies keine Untersuchungen hinsichtlich der Zusammensetzung der Biofilmmatrix vorliegen, wurden verschiedene Lektine mit einem breit gefächerten Spektrum an Bindungseigenschaften gewählt.

Die vorliegenden Aufnahmen (Abb. 28) zeigen mögliche EPS-Komponenten auf. Es wurden spezifische Zuckerreste in der EPS mit Hilfe von Concanavalin A anhand einer Rotfärbung nachgewiesen, wogegen die Bakterienzellen grün fluoreszierten. Anhand der Aufnahmen mittels CLSM (C und D) wurden einzelne EPS-Ansammlungen detektiert, welche mit Hilfe der normalen Fluoreszenzaufnahmen nicht nachweisbar waren (A). Interessanterweise wurde auch N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure mittels WGA-Lektinfärbung als potentieller Bestandteil der EPS nachgewiesen (B). Das Vorhandensein vieler Glykoproteine

in der Biofilmmatrix wurde anhand der PHA-Markierung und CLSM-Dokumentation detektiert werden (E). Die Visualisierungsanalysen im Rahmen der EPS-Untersuchungen dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Matrix von *S. pyogenes* Biofilmen aus verschiedenen Komponenten zusammengesetzt ist.

### 3.3 Untersuchungen zur Langzeitkultivierung von *S. pyogenes* Biofilmen

#### 3.3.1 Charakterisierung von Biofilm-Langzeitkulturen (LK)

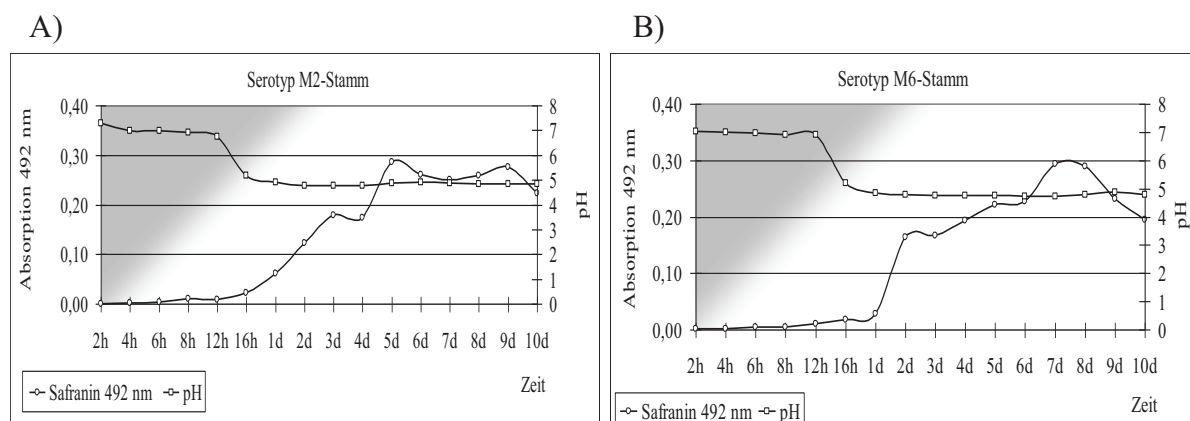
*S. pyogenes* besitzt die Möglichkeit, neben akuten Infektionen auch als zunächst asymptomatischer Besiedler unter bestimmten Umgebungsbedingungen rezidivierende Erkrankungen des Wirtes zu verursachen (Kap. 1.4.2.). Die Bindung der Bakterien über verschiedene Adhärenzmechanismen an die Epithelzellen des Rachens stellt eine notwendige Voraussetzung sowohl für eine erfolgreiche Infektion als auch für eine Biofilmbildung dar. Aufgrund der Fähigkeit, an eukaryotische Zellen zu adhären und in diese zu internalisieren, entzieht sich *S. pyogenes* den Angriffen des Immunsystems bzw. der Wirkung von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, da diese intrazellulär nicht zu bakteriziden Konzentration akkumulieren (208). Auch die Fähigkeit zur Biofilmbildung von *S. pyogenes* könnte zur längeren Überlebensfähigkeit im Wirt beitragen.

Für eine Reihe von Bakterien ist bekannt, dass sie mittels spezifischer Anpassungsmechanismen Wochen und Monate in menschlichen Zellen zu überleben, ohne eine Infektion auszulösen (129, 188). Diese besondere Form der Anpassung ist gekennzeichnet durch eine ausgeprägte Resistenz bzw. Toleranz gegenüber verschiedenen äußeren Einflüssen. Ungünstige Umweltbedingungen wie Nährstoffmangel, pH und Temperaturschwankungen können so überdauert werden. Charakteristisch für diese Phase ist, dass Bakterien in diesem Lebenszyklus Veränderungen sowohl auf zellulärer als auch genetischer Ebene aufweisen (166, 167). Ein besonderes Merkmal ist der Verlust der Fähigkeit der Bakterien, unter *in vitro* Bedingungen auf festen Nährböden zu wachsen. Daher wird dieser Zustand auch als „*viable, but nonculturable state*“ (VBNC) bezeichnet. Auch für einige humanpathogene Erreger wurde diese besondere Eigenschaft beschrieben und als Virulenzmechanismus eingestuft.

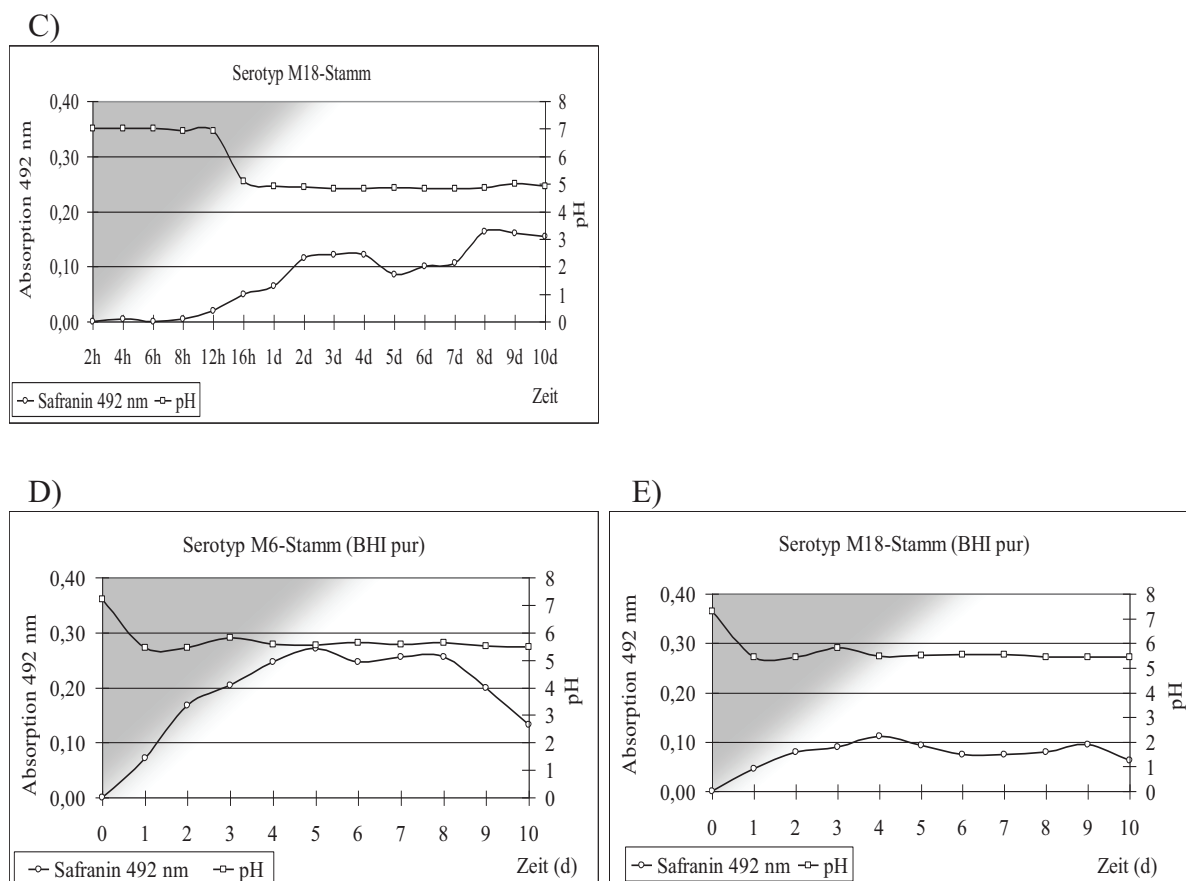
Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausgewählte Kulturmedien und verschiedene Inkubationsbedingungen für Langzeitkulturen getestet, die einen Übergang von kultivierbaren zu VBNC-ähnlichen Zellen bewirken können. Dafür erfolgte die Bestimmung mehrerer Parameter: Der Nachweis der Biofilmmasse mittels Safranin Test (Kap. 2.2.5), die Gesamt (GZZ)- und Lebendkeimzahlbestimmung (LKZ) (Kap. 2.2.7) sowie die pH-Wert Messung des Kulturüberstandes der Biofilmkultur.

### 3.3.2 Induktion eines VBNC-ähnlichen Status der Biofilmzellen in LK

Zusätzlich zum Standardkulturmedium BHI wurden das THY Medium sowie das C-Medium für die Untersuchungen des VBNC-ähnlichen Eintritts ausgewählt. Des Weiteren erfolgte die Kultivierung mit und ohne Zusatz von 0,5 % Glukose aufgrund der Annahme, dass u. a. ein Nährstoffmangel den VBNC-ähnlichen Status verursachen kann. Die vorangegangenen Versuche dieser Arbeit zeigten, dass es zu einer Veränderung der Biofilmbildung bei anaerober Inkubation (37 °C) sowie unter niedrigen Temperaturbedingungen kam. Diese Kultivierungsbedingungen wurden auch hier für die Untersuchungen einer möglichen VBNC-Induktion miteinbezogen. In den folgenden Versuchen wurden zunächst die Parameter pH-Wert des Kulturüberstandes und Biofilmmasse als mögliche Induktoren des VBNC-Status untersucht. Im Folgenden ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse dargestellt (Abb. 29), die über einen Zeitraum von insgesamt zehn Tagen durchgeführt wurden.







**Abb. 29:** Bestimmung der Biofilmbildung mittels Safranin Test und Medium pH-Wert Messungen der *S. pyogenes* Kulturen in BHI Medium mit und ohne 0,5 % Glukose. Die Dokumentation der Biofilmentwicklung erfolgte auf der primären, die der pH-Werte auf der sekundären y-Achse. Die Versuche wurden über einen Zeitraum von zehn Tagen durchgeführt. Die Safraninfärbung erfolgte in 24 Stunden-Intervallen mit anschließender Absorptionsmessung bei 492 nm. Dargestellt sind die Ergebnisse in BHI Medium mit Glukose für die Stämme der Serotypen M2 (A), M6 (B) und M18 (C) sowie exemplarisch für das Wachstum in BHI Medium ohne Glukose vom Serotyp M6-Stamm (D) und M18-Stamm (E), wobei während des erstens Inkubationstages keine Detaildaten ermittelt wurden.

Die Untersuchungen ergaben, dass bei allen drei getesteten Stämmen die Biofilmbildung mit einer Absenkung des pH-Wertes nach etwa 16 Stunden Inkubation einherging. Für die Stämme verringerte sich dabei der pH-Wert im Kulturüberstand von 7,3 auf 4,9 bis 24 h nach Beginn der Inkubation. In parallele zeigte sich ein Anstieg der Safraninabsorption gleich bedeutend mit einer Zunahme der Biofilmmasse. Des Weiteren konnte eine maximale Biofilmentwicklung für die Stämme der Serotypen M2 nach fünf Tagen (Abb. 29, A), M6 nach acht Tagen (Abb. 29, B) und M18 (Abb. 29, C) nach vier Tagen beobachtet werden. Die Biofilmmasse vom Serotyp M2-Stamm und M6-Stamm nahm nach zehn Tagen Inkubation auch wieder ab.

Zusätzlich konnte in zeitlich versetzten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen einer Kultur des Serotyp M2-Stammes in BHI Medium mit Glukose die Biofilmbildung dokumentiert werden (Abb. 31). Dazu erfolgte jeweils zu den Inkubationszeitpunkten vier, sechs, 16 und 24 Stunden eine mikroskopische Aufnahme nach Lebend/Tot Färbung sowie die Ermittlung des pH-Wertes in den Kulturen.

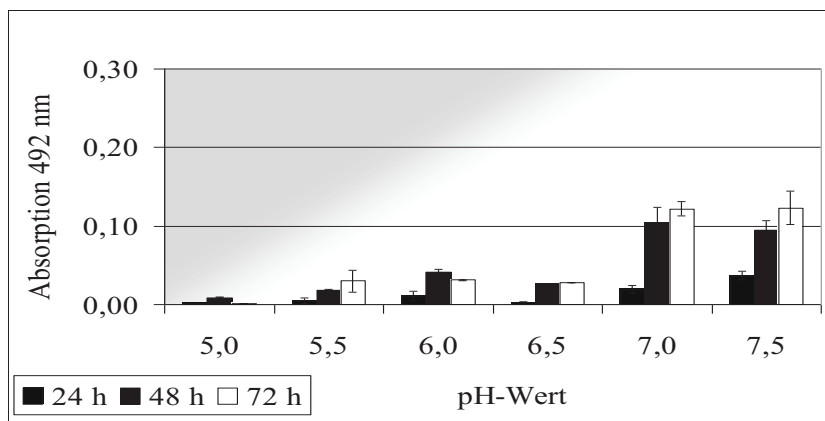
Es wurde eine stetige Abnahme des pH-Wertes von 7,3 (Zeitpunkt der Inokulation), über 6,9 nach vier Stunden, zu 5,2 nach 16 h und 4,8 nach 24 h nachgewiesen. Parallel zur pH-Absenkung wurde die Entwicklung von einzelnen Mikrokolonien nach vier und sechs Stunden auf der Oberfläche mikroskopisch dokumentiert werden, die sich zu adhärennten Biofilmkumpen nach 16 Stunden und anschließend zu einem mehrschichtigen Biofilm nach 24 Stunden entwickelten. Diese Ergebnisse deuten an, dass ein pH-Wert unter 5,0 die *S. pyogenes* Biofilmbildung initiieren könnte.

Daraufhin wurde die Wirkung verschiedener pH-Werte auf den Beginn der *S. pyogenes* Biofilmbildung untersucht (Abb. 30). Dafür wurden BHI Medien mit sechs unterschiedlichen pH-Werten (5 – 5,5 – 6 – 6,5 – 7 und 7,5) aber ohne Pufferzusatz hergestellt und anschließend für die Versuchsansätze noch mit 0,5 % Glukose versetzt. Exemplarisch dargestellt sind die Ergebnisse für den Serotyp M2-Stamm. Es konnte gezeigt werden, dass ein niedriger initialer pH-Wert von 5 bis 6 die Biofilmbildung inhibierte. Erst ein pH-Wert ab 7 begünstigte die Entwicklung von Mikrokolonien und im weiteren Inkubationsverlauf die Bildung von Biofilmmasse.

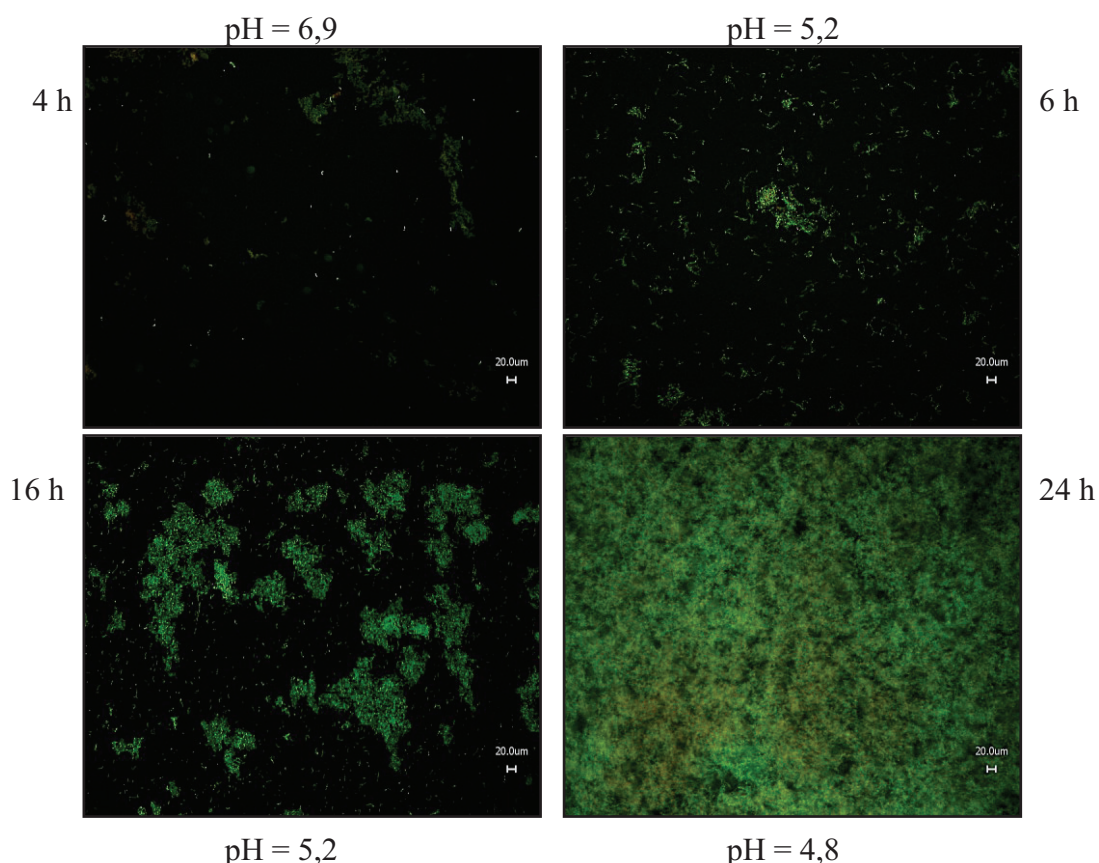
Demgegenüber standen die Resultate aus Versuchen mit BHI Medium ohne Glukose. Exemplarisch werden die Analysen mit dem Serotyp M6-Stamm (Abb. 29, D) und M18-Stamm (Abb. 29, E) gezeigt. Bei beiden Stämmen wurde eine geringere Absenkung des pH-Wertes bis 5,5 gemessen, wobei für den Serotyp M6-Stamm dieser pH-Wert nach einem Tag und für den Serotyp M18-Stamm in weniger als 24 Stunden erreicht wurde.

Dieser Wert liegt deutlich über dem pH, der sich in den Versuchen unter Glukosezugabe ergab. Wie schon in den vorigen Analysen (Kap. 3.1.1) veranschaulicht, entwickelte der M18-Stamm im Vergleich zum M6-Stamm eine geringere Biofilmmasse unter Glukosemangel. Für den Serotyp M6-Stamm war kein Bezug zwischen pH-Wert des Mediums und der Biofilminduktion zu entdecken, allerdings nahm die Biofilmmasse für diesem Keim unter Glukosemangel weniger rasch zu, erreichte aber gemessen an den Werten der Safraninfärbung die gleiche maximale Menge wie unter Glukosezusatz (Abb. 29, B).





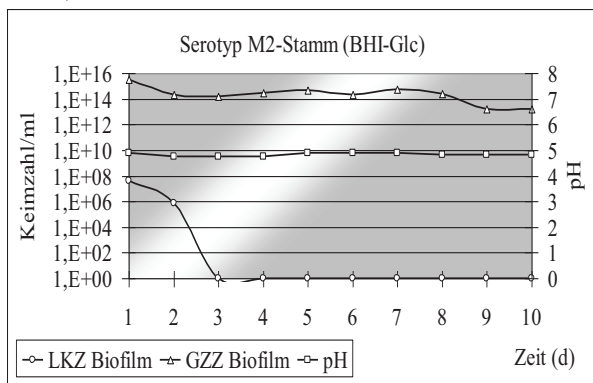
**Abb. 30:** *S. pyogenes* Biofilmbildung in BHI Medium in Relation zum initialen pH-Wert des Kulturmediums. Die Bestimmung der Biofilmmasse erfolgte mittels Safranin Test. Dargestellt sind die Ergebnisse der Biofilmquantifikationen vom *S. pyogenes* Serotyp M2-Stamm. Die Safraninfärbung erfolgte in 24 Stunden-Intervallen mit anschließender Absorptionsmessung bei 492 nm. Die Dokumentation der Biofilmbildung erfolgte über einen Zeitraum von drei Tagen. Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus mind. drei unabhängigen Versuchen.



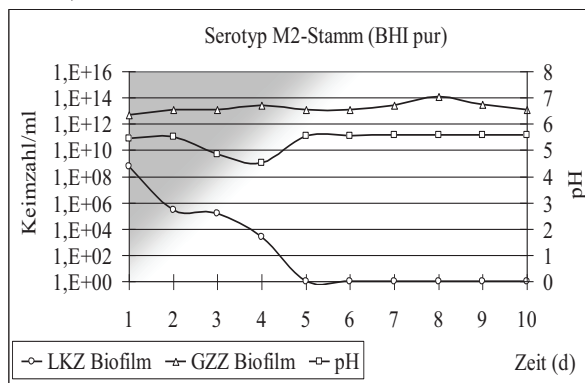
**Abb. 31:** Fluoreszenzmikroskopische Dokumentation der pH-Wert Abhängigkeit der *S. pyogenes* Biofilmbildung. Exemplarisch wurde die Biofilmentstehung vom Serotyp M2-Stamm in BHI Medium mit Glukose gezeigt. Dargestellt ist eine zeitliche Abfolge der Biofilmentstehung nach vier, sechs, 16 sowie 24 mittels fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen bei 10-facher Vergrößerung. Über bzw. unter den Aufnahmen ist der finale pH-Wert des Kulturmediums angegeben, der typischerweise nach 24-stündiger Inkubation erreicht wird.

Aus den vorangegangenen Untersuchungen ergab sich die Frage, inwiefern die beobachteten Effekte Einfluss auf einen möglichen Eintritt der *S. pyogenes* Biofilmzellen in eine VBNC-ähnliche Phase nehmen. Um dies zu beantworten, erfolgte die Bestimmung der Lebend- und Gesamtzellzahlbestimmung (Kap. 2.2.7). In der Abbildung 32 wurden die Resultate der Zellzahlbestimmungen für alle drei getesteten Stämme zusammenfassend dargestellt.

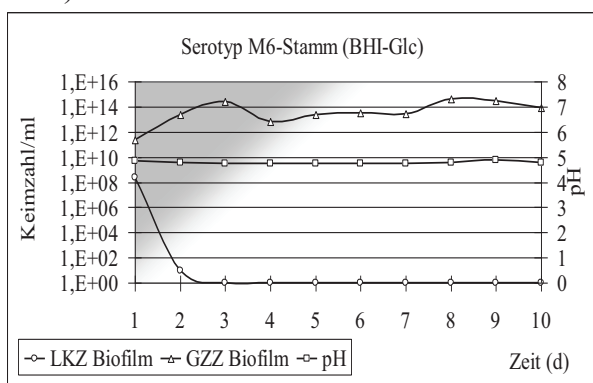
A-1)



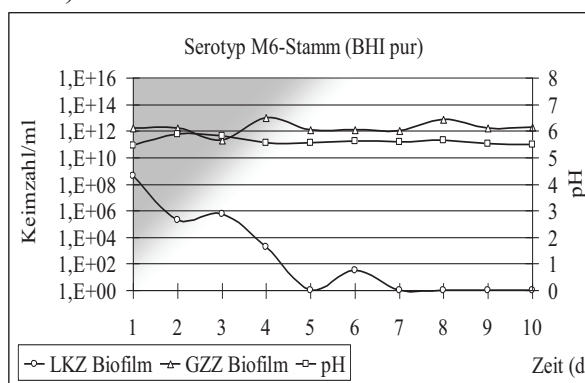
A-2)



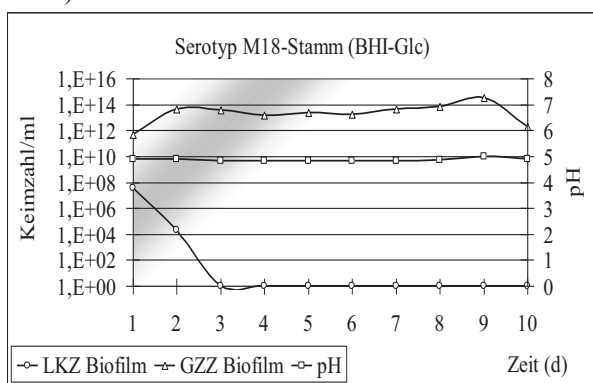
B-1)



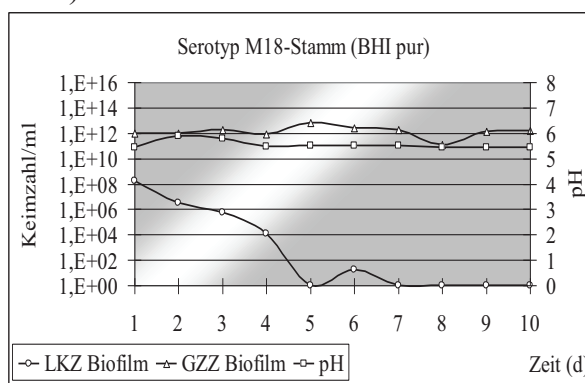
B-2)



C-1)

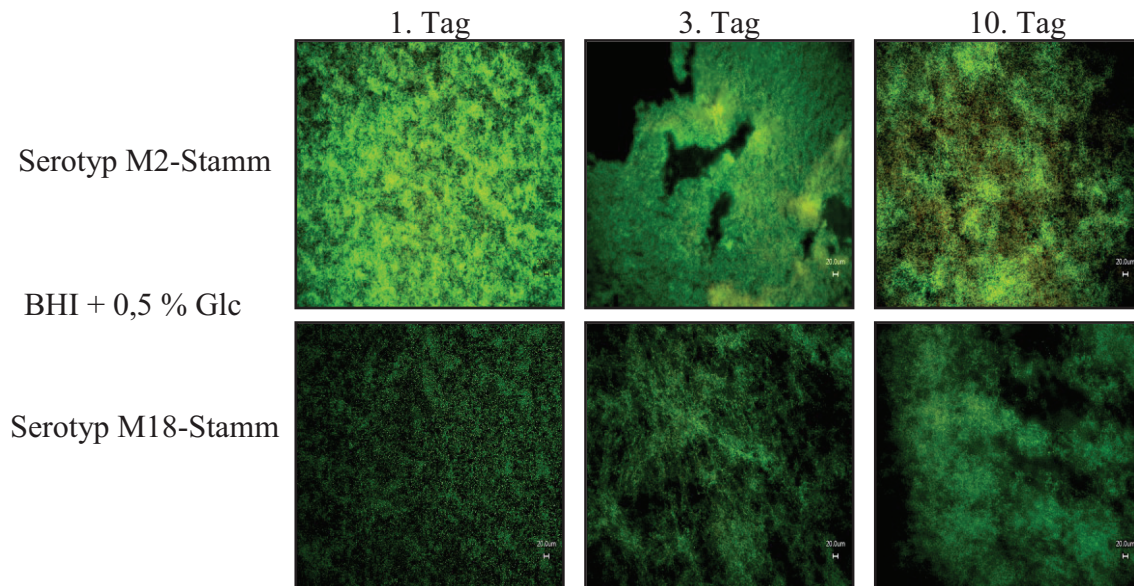


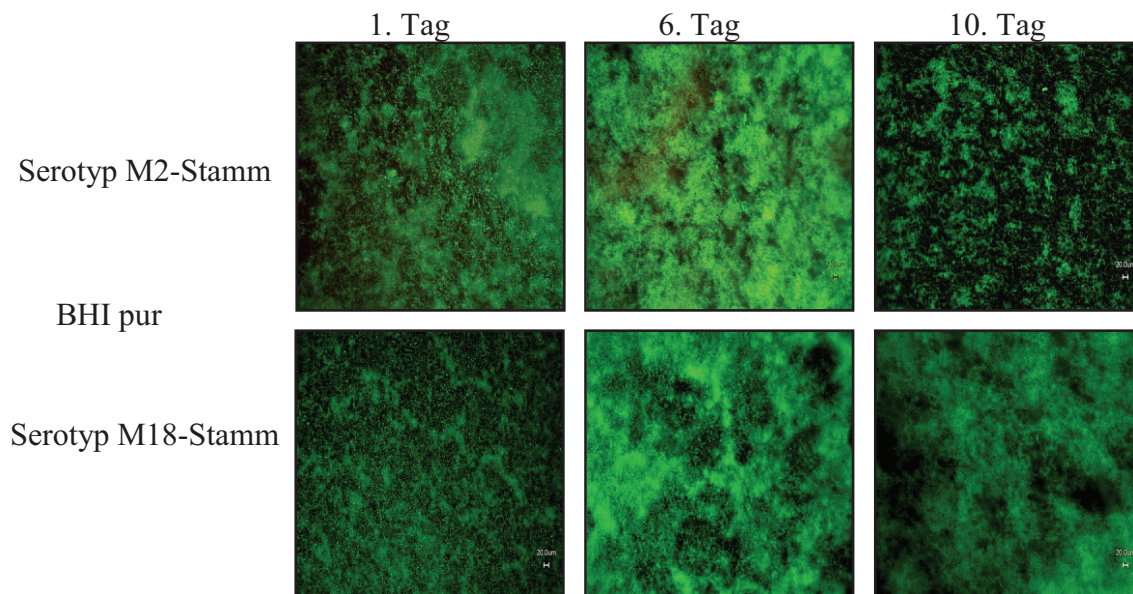
C-2)



**Abb. 32:** Bestimmung der Lebend- und Gesamtzellzahlen der *S. pyogenes* Biofilmkulturen in BHI Medium mit 0,5 % Glukose bzw. in BHI pur. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von zehn Tagen, die LKZ und GZZ wurden in 24 Stunden-Intervallen bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse in BHI Medium mit und ohne Glukose (1) bzw. (2) für die Stämme der Serotypen M2 (A), M6 (B) und M18 (C).

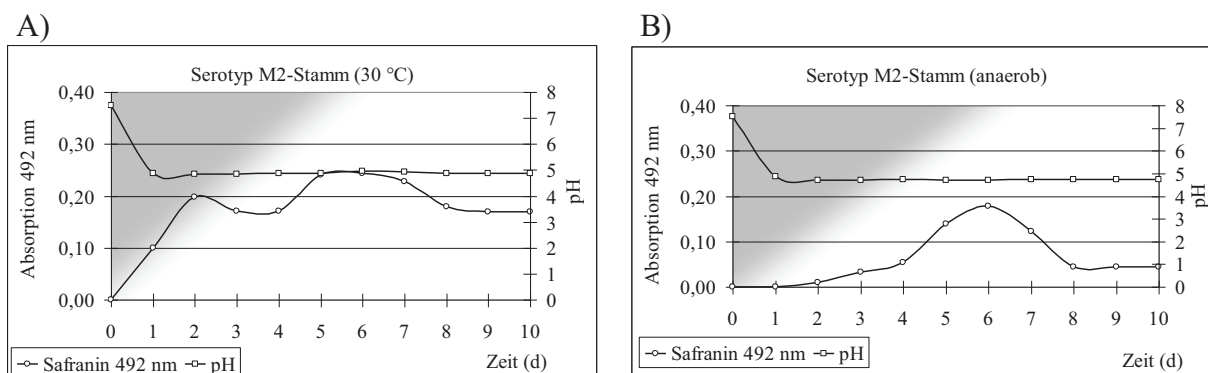
Biofilmzellen aller drei Stämme waren bei Wachstum in BHI Medium + 0,5 % Glukose nach drei Tagen auf Agarplatten nicht mehr anzüchtbar (Abb. 32, A-1, B-1 und C-1). Zu diesem Zeitpunkt sank der pH-Wert ebenfalls unter 5,0 und die Biofilmentwicklung setzte ein (Abb. 29). Zudem konnte eine konstante GZZ über den gesamten Untersuchungszeitraum von zehn Tagen nachgewiesen werden, sowohl in BHI-Glc als auch in BHI pur (ohne Glukose). Diese variierte je nach Serotyp zwischen  $10^{12}$  und  $10^{14}$  Zellen/ml. In parallelen Untersuchungen mit purem BHI Medium konnte noch bis zum Tag fünf eine Lebendkeimzahl detektiert werden (A-2, B-2 und C-2). In diesen Ansätzen blieb die GZZ entweder bei  $\leq 10^{12}$  (Serotyp M18-Stamm) konstant bzw. unterlag geringfügigen Schwankungen (Serotyp M2-Stamm und M6-Stamm). In diesen Versuchsansätzen sank der pH-Wert nicht unter 5,0 (Abb. 29, D und E). Ein entscheidendes Charakteristikum von VBNC-Zellen ist der reversible Verlust der Fähigkeit zur Vermehrung auf festen Nährmedien. Diese Eigenschaft konnte deutlich anhand der Resultate der Lebendkeimzahlbestimmungen (Abb. 32) gezeigt werden. Der Nachweis, dass diese möglichen „VBNC“-Zellen tatsächlich noch am Leben, also vital sind, wurde mit Hilfe der Lebend/Tot Färbung sowie anschließender fluoreszenzmikroskopischer Dokumentation mit dem Keyence Mikroskop BZ 8000 nachgewiesen und in der Abbildung 33 zusammenfassend dargestellt.



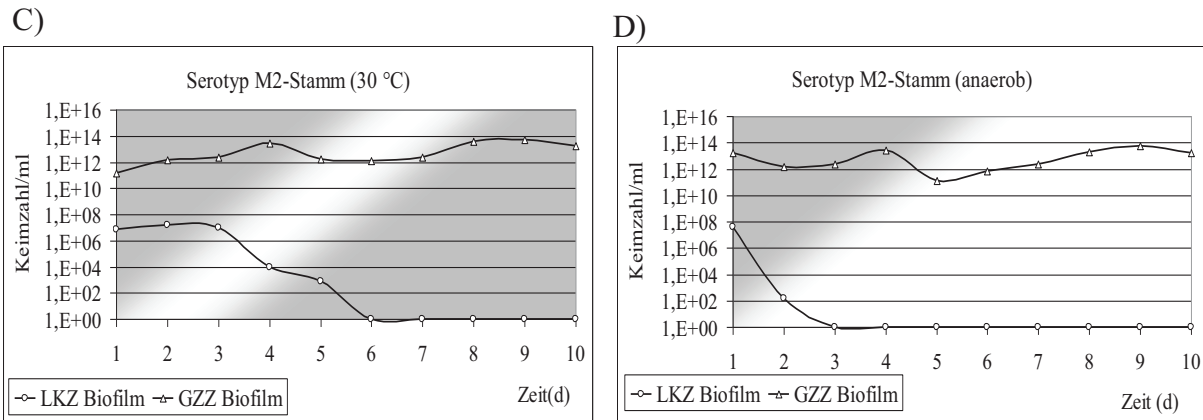


**Abb. 33:** Dokumentation der Vitalität von *S. pyogenes* Zellen in Biofilmen in BHI Medium mit und ohne 0,5 % Glukose vor bzw. nach dem Eintritt in einen möglichen „VBNC“-Status. Dargestellt sind exemplarisch die Ergebnisse in BHI Medium mit Glukose für die Stämme der Serotypen M2 und M18 am Tag 1, Tag 3 sowie Tag 10 der Inkubation. Die Daten für den Vitalitätsnachweis der Biofilmzellen in BHI Medium ohne Glukose werden exemplarisch für die Stämme der Serotypen M2 und M18 an Tag 1, Tag 6 und Tag 10 der Inkubation dargestellt. Die Vergrößerung beträgt 10-fach.

Wie schon in den vorangegangenen Versuchen gezeigt, können Veränderungen der Umgebungstemperatur von 37 °C auf 30 °C sowie eine anaerobe Atmosphäre die Biofilmbildung beeinflussen (Kap. 3.1.2.4. und 3.1.2.5.). Inwieweit diese Effekte auch eine Induktion eines möglichen „VBNC“-Eintritts verursachen können, zeigten weitere Versuche, die in der Abbildung 34 zusammenfassend dargestellt wurden.



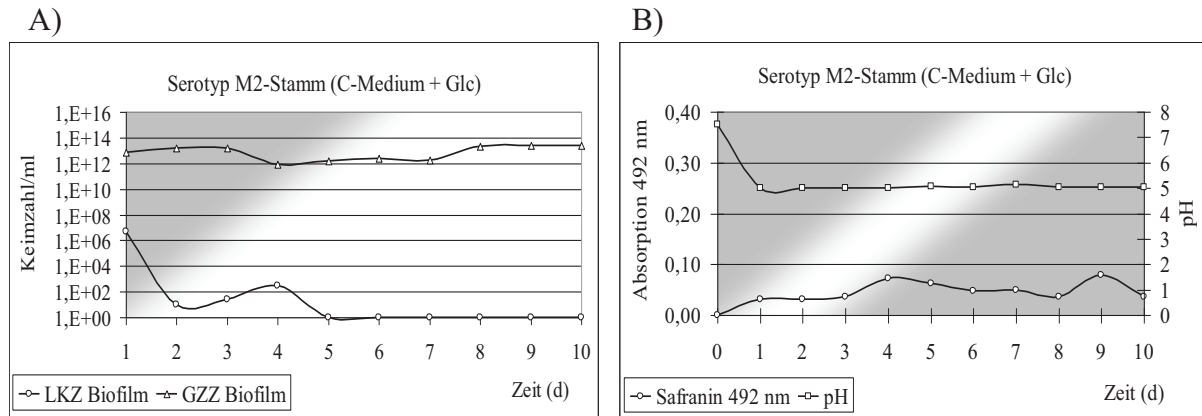




**Abb. 34:** Bestimmung der Biofilmbildung mittels Safranin Test und pH-Wert Messungen der *S. pyogenes* Kulturen in BHI Medium mit 0,5 % Glukose (A und B) sowie die Bestimmung der Lebend- und Gesamtzellzahlen (C und D) im selben Medium. Die Dokumentation der Biofilmentwicklung erfolgte auf der primären, die der pH-Werte auf der sekundären y-Achse. Die Versuche wurden über einen Zeitraum von zehn Tagen durchgeführt. Die Safraninfärbung erfolgte in 24 Stunden-Intervallen mit anschließender Absorptionsmessung bei 492 nm. Dargestellt sind exemplarisch die Ergebnisse in BHI Medium mit Glukose für den Serotyp M2-Stamm bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C (A und C) sowie unter anaeroben Bedingungen (B und D).

Die Grafiken der Abbildung 34 lassen Effekte aufgrund veränderter Umweltbedingungen erkennen. Bei Wachstum bei 30 °C setzte die Biofilmbildung unmittelbar mit der Senkung des pH-Wertes < 5,0 ein. Dagegen trat der Verlust der Kultivierbarkeit von Biofilmzellen bei 30 °C erst nach sechs Tagen ein. Unter anaeroben Bedingungen begann die Biofilmbildung erst drei Tage nach Erreichen des niedrigen pH-Wertes, dagegen wurde der mögliche „VBNC“-Zustand deutlich früher als bei der 30 °C Kultur erreicht (Abb. 34, C und D). Bemerkenswert ist auch die Abnahme der Safranin-färbbaren Biofilmmasse nach acht Tagen Inkubation unter anaeroben Bedingungen (Abb. 34, B). Die GZZ der Biofilme unter anaeroben Bedingungen sowie bei 30 °C waren deutlich geringer als die, welche bei kultivierten Biofilmen unter Wachstum bei 37 °C und mikroaerophilen Bedingungen (Abb. 32, A-1, B-1 und C-1) bestimmt wurden.

Anschließend sollte die Frage geklärt werden, inwiefern die Fähigkeit der Biofilmbildung von *S. pyogenes* im Zusammenhang mit einem VBNC-ähnlichen Status steht. Für diese Untersuchungen wurde exemplarisch das C-Medium gewählt, da es nachweislich die Biofilmbildung von *S. pyogenes* nicht unterstützte (s. Abb. 7b).



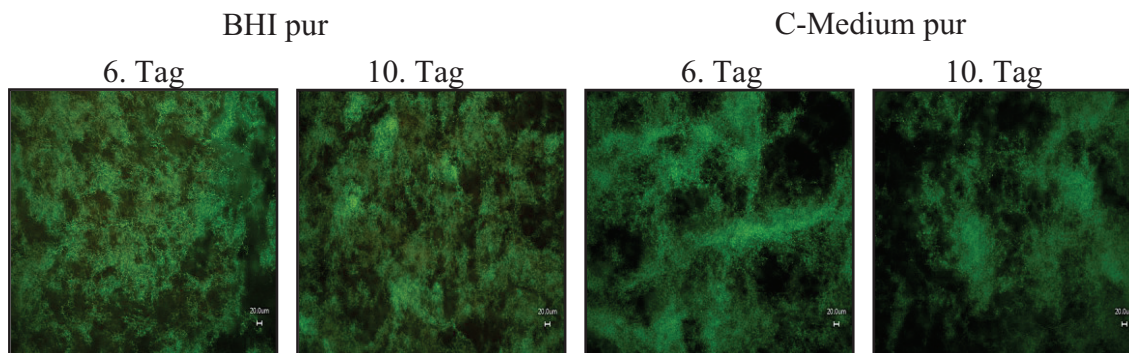
**Abb. 35:** Bestimmung der Biofilmbildung mittels Safranin Test und pH-Wert Messungen (A) von *S. pyogenes* Serotyp M2-Stamm Kulturen in C-Medium mit 0,5 % Glukose sowie die Bestimmung der Lebend- und Gesamtzellzahlen (B) im selben Medium. Die Dokumentation der Biofilmentwicklung (A) erfolgte auf der primären, die der pH-Werte auf der sekundären y-Achse. Die Safraninfärbung erfolgte in 24 Stunden-Intervallen mit anschließender Absorptionsmessung bei 492 nm. Die Versuche wurden über einen Zeitraum von zehn Tagen durchgeführt.

Wie erwartet bildeten die Bakterien unter diesen Bedingungen während der ganzen zehn Tage keine nennenswerten Biofilmmassen (Abb. 35, A). Trotzdem war nach 24 Stunden Inkubation ein pH-Wert von  $\leq 5,0$  meßbar, welcher über den gesamten Zeitraum von zehn Tagen stabil blieb. Andererseits deuteten die Ergebnisse der Lebendkeimzählung die Induktion eines möglichen „VBNC“-Eintritts nach fünf Tagen an (Abb. 35, B).

Zusammenfassend wiesen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Biofilmbildung und der mögliche Eintritt in den „VBNC“-Status für *S. pyogenes* Zellen unabhängige Ergebnisse sind.

Zusätzlich erfolgte die Dokumentation der Vitalität der Biofilmzellen im „VBNC“-Status. Dazu wurden Biofilmkulturen aus BHI Medium mit Glukose unter anaeroben Wachstumsbedingungen sowie aus C-Medium mit Glukose unter Standardbedingungen mittels Lebend/Tot Färbung markiert (Kap. 2.2.3.1) und mikroskopiert. Die Ergebnisse sind zusammenfassend in der Abbildung 36 dargestellt.

Die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchungen bestätigten die vorangegangenen Messungen im Rahmen der Lebendkeimzählung.



**Abb. 36:** Dokumentation der Vitalität von *S. pyogenes* Biofilmzellen in BHI und C-Medium mit 0,5 % Glukose nach dem Eintritt in den „VBNC“-Status. Die Ergebnisse sind exemplarisch für den Serotyp M2-Stamm dargestellt. Die Bilder geben die Strukturen nach der Inkubation unter anaeroben Bedingungen in BHI und C-Medium an Tag 6 bzw. Tag 10 der Inkubation wieder. Die Vergrößerung ist 10-fach.

### 3.3.3 Sensitivität von Biofilmzellen in LK gegenüber verschiedenen Lysinen

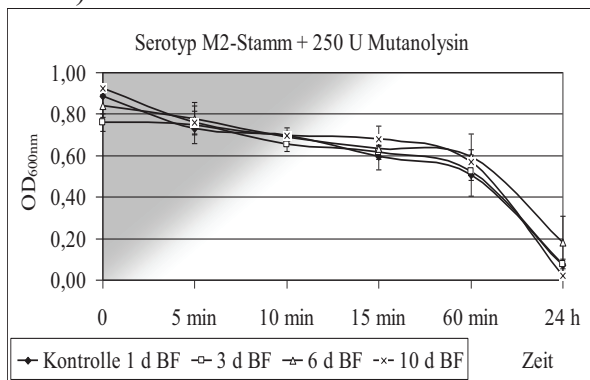
Bei Langzeitkultivierungen von bakteriellen Biofilmen im VBNC-Status wurde u. a. von Signoretto *et al.* (211) gezeigt, dass sich die biochemische Zusammensetzung der bakteriellen Zellwand mit der VBNC-Lebensdauer verändert (179). Inwiefern sich diese biochemischen Strukturveränderungen auf die Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber zellwandabbauenden Enzymen auswirken können, sollte in diesem Teil der Arbeit an *S. pyogenes* Biofilmzellen im möglichen „VBNC“-Status getestet werden.

Dafür wurden die Biofilmzellen in 1x PBS suspendiert und alle zu untersuchenden Proben auf eine einheitliche  $OD_{600nm}$  eingestellt. Nach Zugabe des Enzyms erfolgte die Bestimmung der  $OD_{600nm}$  in Abhängigkeit von der Zeit (Kap. 2.2.9.2).

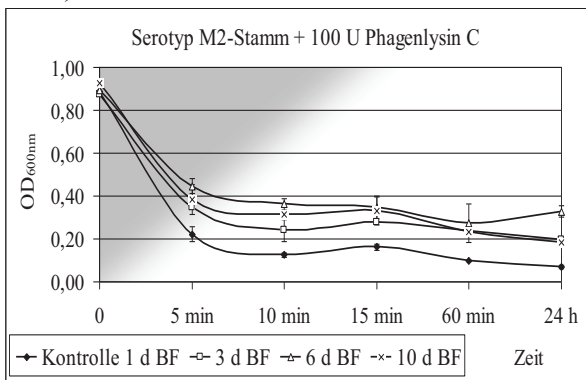
Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden Enzyme Mutanolysin (Mut) und Phagenlysin C (PlyC) mit jeweils 250 U/ml und 100 U/ml auf Biofilmzellen gegeben. Die Aktivität der Enzyme konnte anhand der Abnahme der Trübung über die Messung der  $OD_{600nm}$  detektiert werden. Zusätzlich wurde die Wirkung der Enzyme allein und in Kombination untersucht. Die Ergebnisse sind zusammenfassend in der Abbildung 37 dargestellt.



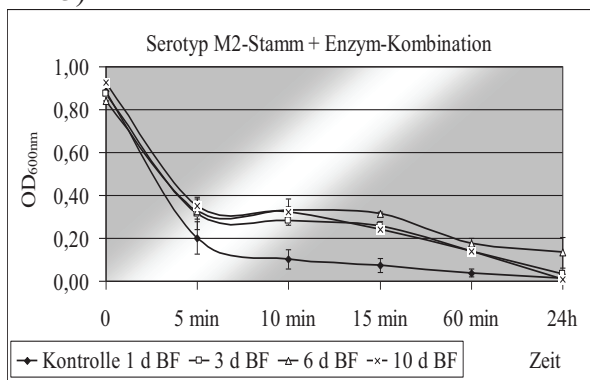
A-1)



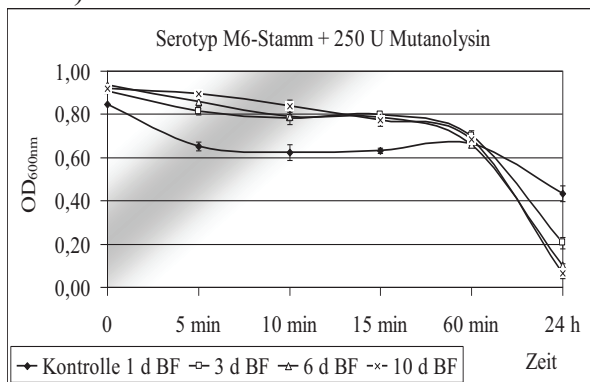
A-2)



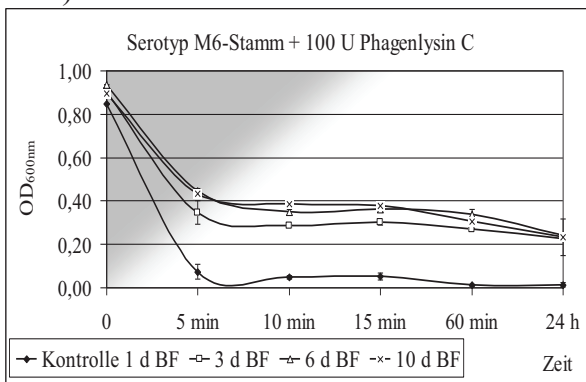
A-3)



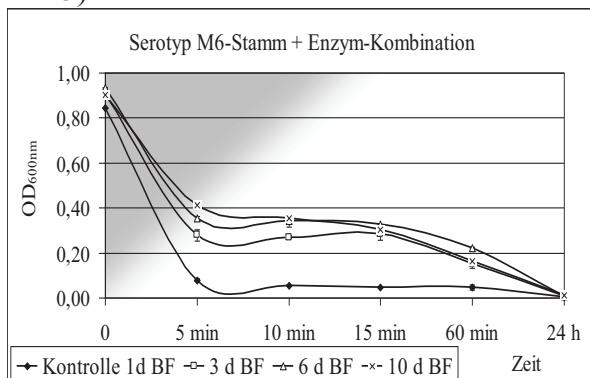
B-1)

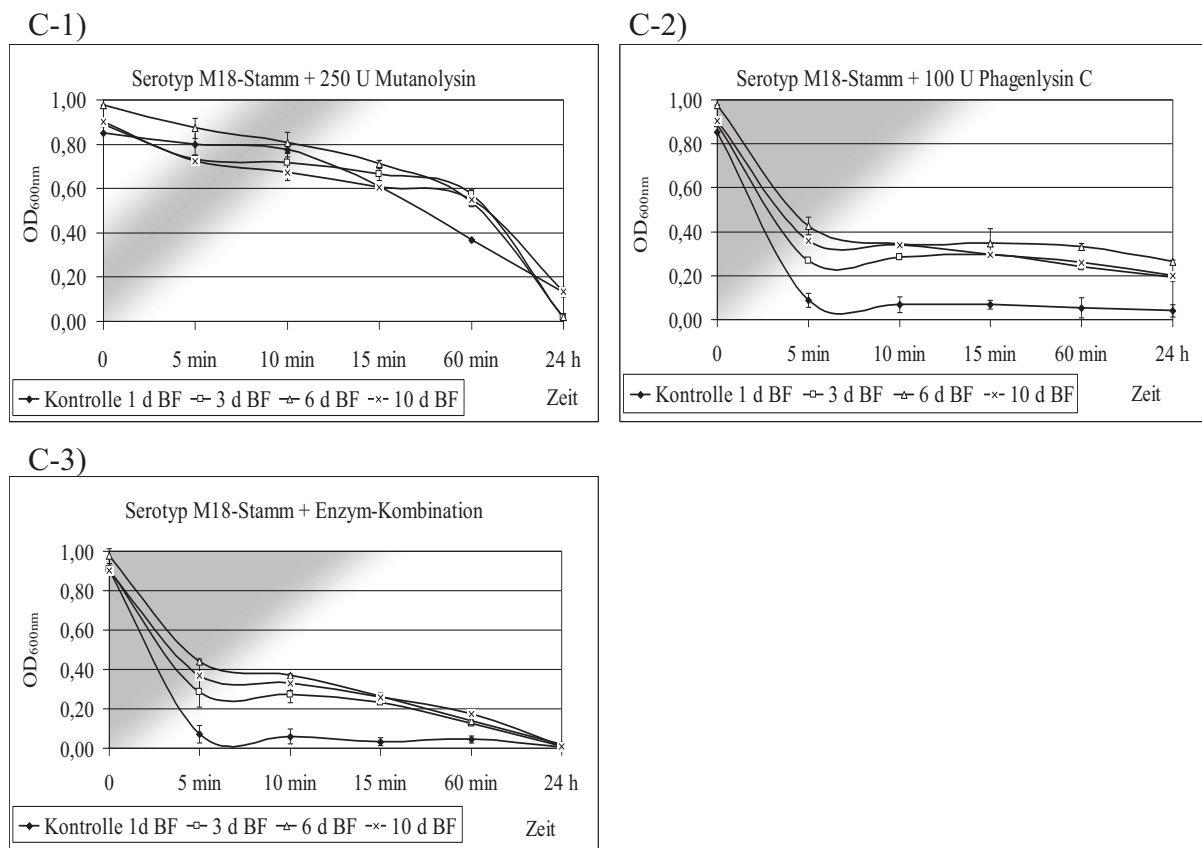


B-2)



B-3)





**Abb. 37:** Wirkung von Lysinen auf *S. pyogenes* Biofilmzellen nach vorangegangener Langzeitkultivierung in BHI Medium und 0,5 % Glukose. Gezeigt sind die Ergebnisse für die einzelnen Enzyme Mutanolysin (1) und PlyC (2) und für eine 1:1 Kombination der beiden Enzyme (3). Getestet wurden alle drei *S. pyogenes* Stämme der Serotypen M2 (A), M6 (B) und M18 (C). Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus mind. zwei unabhängigen Versuchen.

Für die Untersuchungen wurden drei verschiedene Inkubationszeitpunkte ausgewählt. Nach drei, sechs und zehn Tagen erfolgte jeweils die Enzymbehandlung mit anschließender Trübungsmessung. Die Versuche mit den einzelnen Enzymen zeigten bei allen drei Stämmen ähnliche Ergebnisse.

Als Referenz wurden Biofilmzellen gewählt, die nach 1-tägiger Inkubation geerntet und behandelt wurden. Diese Zellen waren zu diesem Zeitpunkt noch kultivierbar.

Für Mutanolysin konnte gezeigt werden, dass es zu einem langsamen Abbau der Biofilmzellen unabhängig von deren Vorinkubation kam, was anhand der Kurvenverläufe für die Trübungsmessungen zu beobachten war (Abb. 37, A-1 bis A-3). Im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigten die potentiellen „VBNC“-Zellen der Stämme der Serotypen M2 und M18 keine höhere Resistenz gegenüber diesem Enzym.

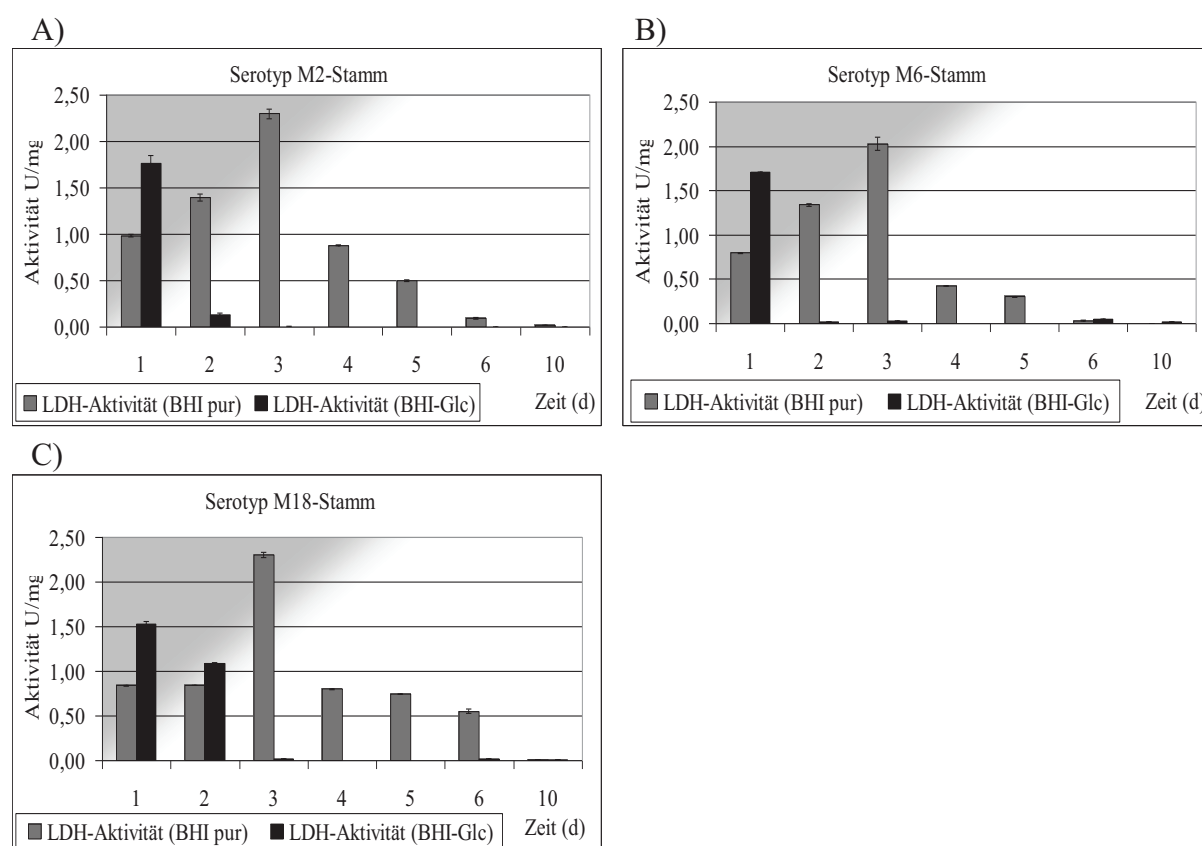
Demgegenüber erwiesen sich die potentiellen „VBNC“-Zellen als um ein vielfaches resistenter gegenüber der Behandlung mit Phagenlysin C (Abb. 37, B-1 bis B-3). Die Kontrollen wurden von diesem Lysin schon nach fünf Minuten Inkubation auf ein Fünftel der Ausgangszellzahl reduziert. Die verringerte Sensitivität gegenüber dem Enzym korrelierte mit der Dauer in der die Zellen bereits im potentiellen „VBNC“-Status waren. Das Phagenlysin C zeigte im Vergleich zum Mutanolysin eine stärkere lytische Aktivität sowohl bei „VBNC“- als auch bei noch wachsenden Zellen.

Die Ergebnisse der Kombination beider Lysine und deren Aktivität auf potentielle „VBNC“-Biofilmzellen sind in der Abbildung 37 (C-1 bis C-3) dargestellt. Die lytische Aktivität beider Enzyme zeigte sich durch eine rapide Abnahme der Zelldichte, besonders ausgeprägt in den Kontrollansätzen (24 Stunden alte Biofilmzellen). Diese Resultate weisen somit darauf hin, dass die Biofilmzellen im potentiellen „VBNC“-Status wesentlich resistenter gegenüber zellwandabbauenden Enzymen sind.

In den vorausgegangenen Versuchen mit Langzeitkulturen von *S. pyogenes* konnte gezeigt werden, dass unter bestimmten Bedingungen die Biofilmzellen in einen potentiellen „VBNC“-Status eintraten (Kap. 3.3.2). Für VBNC-Bakterienzellen konnten in verschiedenen Studien im Vergleich zu kultivierbaren Bakterien eine deutlich verminderte metabolische Aktivität nachgewiesen werden (166). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie lange in *S. pyogenes* Biofilmzellen bei einer Langzeitkultivierung von bis zu zehn Tagen noch ein aktiver Zuckerstoffwechsel zur Energiegewinnung nachweisbar ist. Dafür wurde ein standardisierter enzymatischer Test gewählt, mit dessen Hilfe die Aktivität der Laktat-Dehydrogenase (LDH) als Vitalitätsmarker nachgewiesen werden konnte (Kap 2.2.4). Dieses wichtige glykolytische Schlüsselenzym wandelt Pyruvat zu Laktat unter Oxidation des Kofaktors NADH zu NAD<sup>+</sup> um. Da NADH Licht einer Wellenlänge von 340 nm absorbiert, konnte eine Absorptionsabnahme bei dieser Wellenlänge als Umsatz von NADH detektiert werden konnte. Die Regeneration des NAD<sup>+</sup> konnte somit als Indikator für eine LDH-Aktivität genutzt werden.

In der folgenden Abbildung 38 sind die Resultate zusammenfassend grafisch dargestellt. Die Bestimmung der LDH-Aktivitäten erfolgte in BHI mit 0,5 % Glukose (BHI-Glc) und BHI pur für alle drei *S. pyogenes* Stämme. Es wurden sieben Versuchszeitpunkte vor und nach dem Eintritt in die potentielle „VBNC“-Phase ausgewählt. Wie zu erwarten war, zeigten sich sehr hohe Enzymaktivitäten vor dem Eintritt und eine starke Abnahme der LDH-Aktivität nach Eintritt in den „VBNC“-Status.

Für alle drei Stämme konnte in BHI pur ein Maximum an LDH-Aktivität von etwa 2,0 U/mg noch in 72 Stunden alten Zellen detektiert werden. Im Vergleich dazu erreichten die Zellen in BHI-Glc bereits nach 24 Stunden ihr LDH-Maximum von 1,5 bis 1,7 U/mg. Je älter und damit auch länger die untersuchten Biofilmzellen im potentiellen „VBNC“-Status waren, desto geringer wurde auch die nachweisbare LDH-Aktivität. So war in Zellen aller drei Stämme bei Wachstum in BHI pur noch bis zum 5. und 6. Inkubationstag eine relevante LDH-Aktivität nachweisbar (Abb. 38, C). Bei Wachstum in BHI-Glc dagegen nur bis zum zweiten Inkubationstag. Zusammen mit den vorherigen Daten bedeutet dies: Gemessen an der LDH-Aktivität treten die *S. pyogenes* Biofilmzellen in parallele zu einem potentiellen „VBNC“-Zustand auch in einen metabolisch inerten Zustand ein.



**Abb. 38:** Bestimmung der LDH-Aktivität von *S. pyogenes* Biofilmzellen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Enzymaktivitäten zu unterschiedlichen Inkubationszeitpunkten von Stämmen der Serotypen M2 (A), M6 (B) und M18 (C). Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus mind. drei unabhängigen Versuchen.

### 3.3.4 Wirkung von Antibiotika auf etablierte Biofilmstrukturen

Für viele humanpathogene Erreger wurde beschrieben, dass sie sowohl unter *in vitro* als auch *in vivo* Bedingungen als Biofilm-organisierte Zellen gegenüber Antibiotika (AB) weniger sensitiv sind als in ihrer planktonischen Lebensform (95, 137). Als Antibiotikum der Wahl bei *S. pyogenes* Infektionen wird vorrangig Penicillin eingesetzt. Da *S. pyogenes* über keinen der klassischen Resistenzmechanismen gegenüber Antibiotika verfügt –  $\beta$ -Laktamasen bzw. mutierte Penicillinbindeproteine - stellte sich die Frage, ob das Biofilmwachstum als solches einen eigenständigen Resistenzmechanismus darstellen kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Sensitivität von *S. pyogenes* gegenüber verschiedenen Antibiotika in Biofilmstrukturen nach definierten Inkubationszeitpunkten (16 h, 1 d, 2 d und 3 d sowie 10 d) untersucht. Folgende Antibiotika wurden getestet:

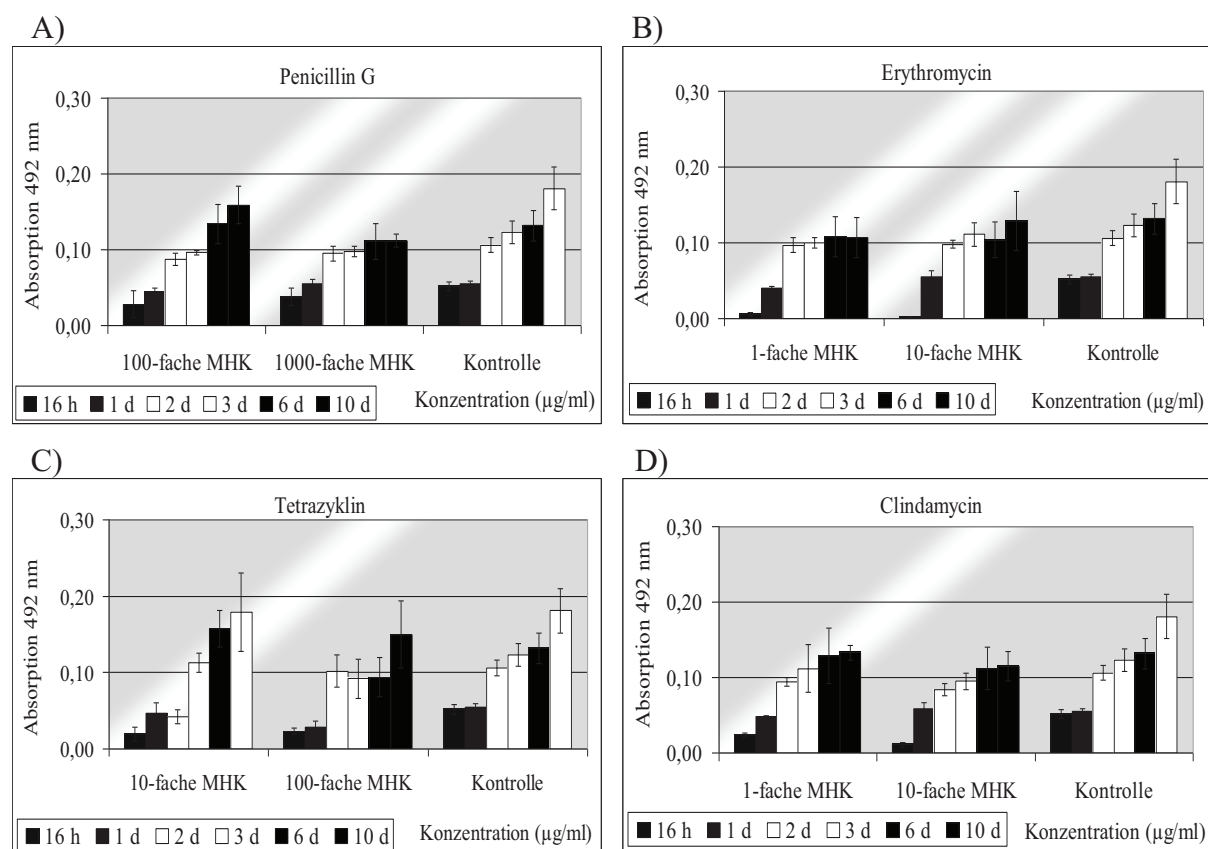
- Penicillin G
- Erythromycin und Tetrazyklin
- Clindamycin und Rifampicin

Mit Hilfe der E-Test<sup>®</sup> Methode wurde die Minimale Hemmkonzentration (MHK) des jeweiligen Antibiotikums für planktonische Zellen bestimmt (Kap. 2.2.9.1). Diese sind in der Tabelle 7 aufgelistet. Für die Biofilmanalysen machte es keinen Sinn, die zu testenden Antibiotika von Anfang an in das Kulturmedium zu geben, da sich zu diesem Zeitpunkt die Einsaatzellen wie planktonische Zellen verhalten. Deswegen konnte sinnvollerweise nur die Antibiotikumswirkung auf schon vorhandene Biofilme getestet werden. Dazu wurden für die einfache bis tausendfache MHK notwendige Menge des Antibiotikums eingesetzt. Entsprechend den o. g. Voraussetzungen wurde nach definierter Inkubationszeit das Medium von den Biofilmen abgenommen und mit frischem antibiotikahaltigem Medium nochmals für 24 Stunden inkubiert. Danach erfolgte der Safranin Test der behandelten Biofilmmassen (Kap. 2.2.5).

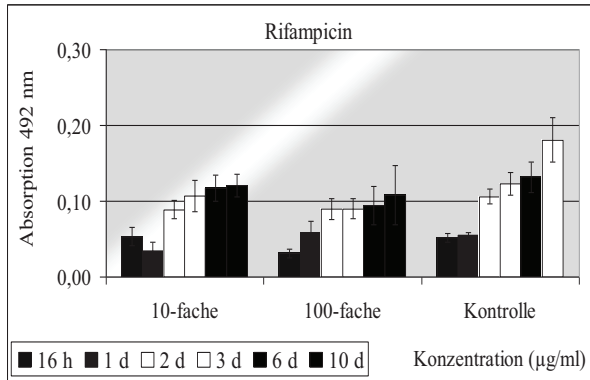
**Tab. 7:** Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration des Serotyp M2-Stammes mit Hilfe des E-Test® Methode

Antibiotikum	MHK Wert (µg/ml)
Penicillin G	0,008
Erythromycin	0,125
Tetrazyklin	0,05
Clindamycin	0,125
Rifampicin	0,032

In diesem Teil der Arbeit wurde exemplarisch der Serotyp M2-Stamm auf die Sensitivität gegenüber Antibiotika im Biofilm untersucht. Die Resultate sind zusammenfassend in der Abbildung 39 dargestellt



E)



**Abb. 39 :** Antibiotische Behandlung von *S. pyogenes* Biofilmzellen. Exemplarisch sind die Ergebnisse des Serotyp M2-Stammes dargestellt. Nach definierten Inkubationszeiten wurden die Biofilme mit dem Antibiotikum versetzt, nochmals für 24 Stunden inkubiert, mit Safranin gefärbt und anschließend die Absorption bei 492 nm bestimmt. Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus mind. drei unabhängigen Versuchen.

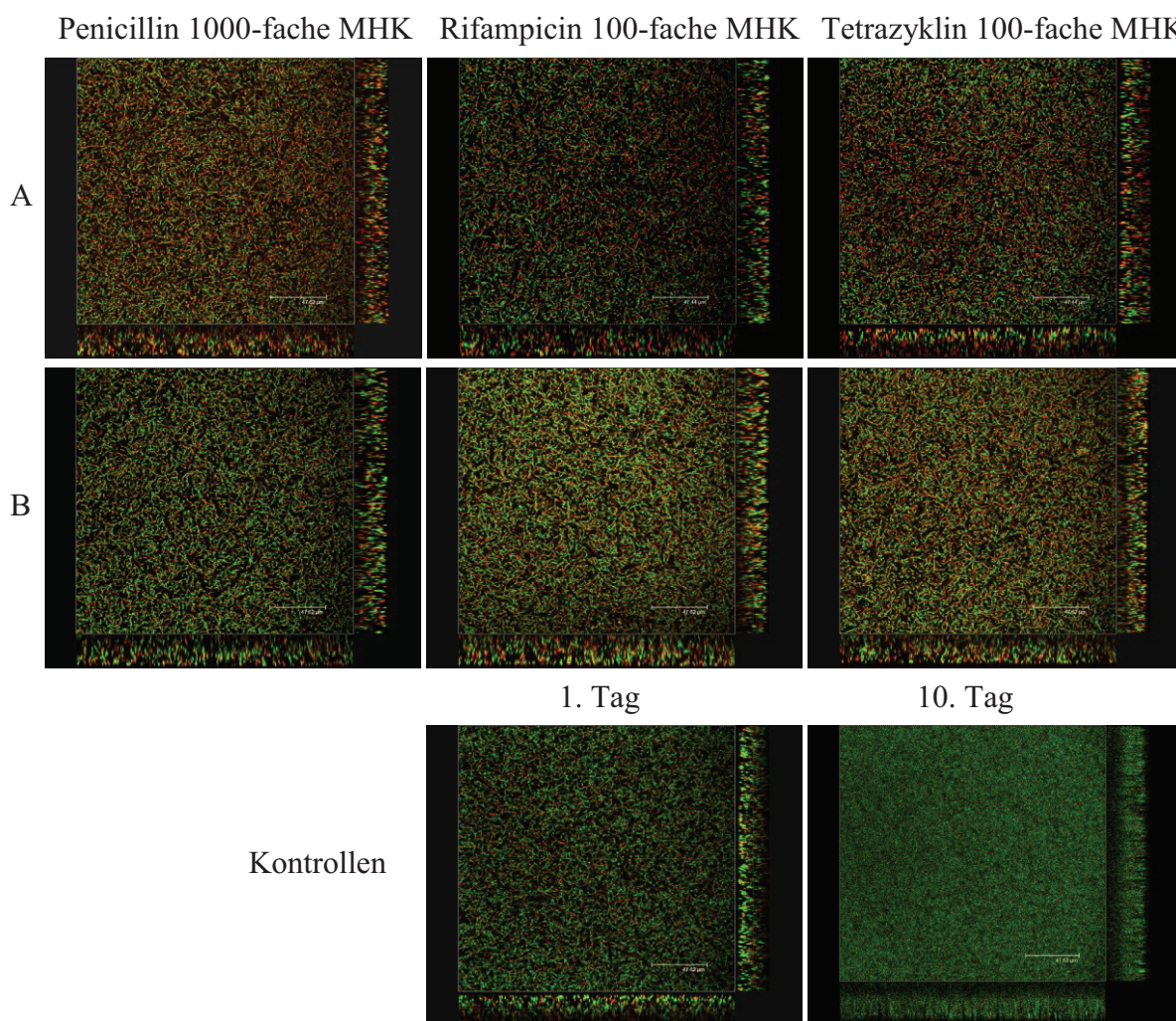
Für Penicillin, das Antibiotikum erster Wahl bei Streptokokkeninfektionen, konnte erst ab einer 1000-fach über der MHK liegenden Konzentration eine geringe Verminderung der Biofilmmassen zu allen getesteten Untersuchungszeitpunkten im Vergleich zu den unbehandelten Biofilmen beobachtet werden (Abb. 39, A). Allerdings konnten existente Biofilmstrukturen auch mit der höchsten Penicillinkonzentration (1000-fache MHK) nicht beseitigt werden. Die hohen Penicillinkonzentrationen überschritten dabei bei weitem die Grenzen der therapeutischen Breite. Daher wäre mit diesem Antibiotikum im infizierten Menschen *in vivo* keine Reduktion von bestehenden *S. pyogenes* Biofilmstrukturen zu erreichen. Selbst eine Applikation auf sehr junge Biofilmstrukturen (16 h Wachstum) konnte nur eine Verringerung und keine vollständige Beseitigung von Biofilmstrukturen bewirken.

Ähnliche Ergebnisse wurden mit Erythromycin, einem Makrolidantibiotikum, erhalten. Auf ältere Biofilmmassen ab zwei Tagen konnten selbst bei einer Konzentration die 10-fach über der MHK von 1,25 µg/ml lag, keine Effekte auf die Biofilmmassen beobachtet werden (Abb. 39, B). Allerdings zeigte sich eine geringe Abnahme der Masse bei zehn Tage alten Biofilmen. Tetrazyklin wirkte nur in einer 100-fach über der MHK liegenden Konzentration von 5 µg/ml insbesondere auf jüngere Biofilme, da es bei diesen zu einer wahrnehmbaren Abnahme der Biofilmmasse kam (Abb. 39, C). Dies gilt ebenso für die getesteten Antibiotika Clindamycin (Abb. 39, D) und Rifampicin (Abb. 39, E), bei denen nur die 10-fach bzw. 100-fach über der MHK liegenden Konzentration Veränderungen der Biofilmmassen hervorriefen.



Insgesamt zeigten die quantitativen Untersuchungen zur Antibiotika-Sensitivität von *S. pyogenes* Biofilmen, dass ältere Biofilmstrukturen resistenter reagieren als jüngere Biofilme. Des Weiteren konnte kein Antibiotikum identifiziert werden, dass in den getesteten Konzentrationen eine vollständige Auflösung der Biofilmmasse verursachte.

Zur Dokumentation der antibiotischen Wirkung auf die Biofilmzellen selbst wurden die behandelten Biofilme mittels CLSM (Kap. 2.2.6.2) untersucht. In Abbildung 40 sind exemplarisch Aufnahmen von Biofilmen des Serotyp M2-Stammes unter Einfluss ausgewählter Antibiotika zusammengefasst.



**Abb. 40:** CLSM-Aufnahmen von ausgewählten Biofilmstrukturen von *S. pyogenes* Serotyp M2-Stamm nach der Behandlung mit verschiedenen Antibiotika. Für die Bilddokumentation wurden die Biofilmzellen mit einem Lebend/Tot Farbstoff gefärbt. Exemplarisch wurden Fluoreszenzaufnahmen von Biofilmen des Serotyp M2-Stammes mit und ohne Antibiotika Zusatz gewählt. Es sind jeweils 1 d (A) und 10 d (B) alte Biofilmstrukturen dargestellt, die mit verschiedenen Antibiotika behandelt wurden. Die gezeigten Bildausschnitte stammen aus einer Sammlung von xyz Serienschnitte der Biofilmschichten. Die Größe des gezeigten Areals beträgt 1024 x 1024  $\mu\text{m}$ . Die Vergrößerung entspricht 60-fach.

**Tab. 8:** Darstellung der Biofilm-Schichtdicken des Serotyp M2-Stammes mit und (ohne) Antibiotika Behandlung als Ergebnis der CLSM-Untersuchungen

Antibiotikum	Anzahl der Serienschritte	Schichtdicke ( $\mu\text{m}$ )
<b>Kontrolle 1 d Biofilm</b>	<b>62</b>	<b>24,32</b>
Penicillin G	53	20,74
Rifampicin	46	17,95
Tetrazyklin	43	16,43
<b>Kontrolle 10 d Biofilm</b>	<b>58</b>	<b>22,73</b>
Penicillin G	39	15,16
Rifampicin	50	19,54
Tetrazyklin	54	21,95

Exemplarisch wurden 24 Stunden und zehn Tage alte Biofilme mit jedem Antibiotikum behandelt und anschließend mittels konfokaler Mikroskopie visualisiert (Abb. 40). Die unbehandelten Biofilme wurden als Kontrollen mitgeführt und zeigten wie erwartet ein ausgeglichenes Verhältnis von lebenden und toten Zellen. Der zehn Tage alte Kontrollbiofilm wies im Vergleich zum 24 Stunden alten Biofilm eine starke Verdichtung der Zellen auf. Im Vergleich der Schichtdicken konnten keine nennenswerten Unterschiede detektiert werden (Tab. 8).

Die Behandlung der Biofilme mit Penicillin führte zu einer starken Zunahme an toten Zellen im jungen Biofilm (A) im Vergleich zum zehn Tage alten Biofilm (B). Letzter war gegen der Schichtdicke des Kontrollbiofilms von 23  $\mu\text{m}$  auf eine Schichtdicke um 15  $\mu\text{m}$  reduziert.

Die CLSM-Ergebnisse, die mit Rifampicin erhalten wurden, bekräftigten die quantitativen Safranin Daten (Abb. 39, E). Der junge Biofilm wurde stärker durch das Antibiotikum beeinflusst, da eine deutliche Zunahme an toten Zellen sowie eine Reduktion der Schichtdicke um 18  $\mu\text{m}$  im Vergleich zu den 24  $\mu\text{m}$  des Kontrollbiofilms gezeigt werden konnte. Demgegenüber wies der zehn Tage alte Biofilm nach Rifampicin Zugabe (B) nur eine geringe Abnahme sowohl in der Zellvitalität als auch der Schichtdicke auf. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die Tetrazyklin behandelten Biofilme erhalten.

## 4 Diskussion

### 4.1 Der Einfluss verschiedener Parameter auf die Biofilmbildung

#### 4.1.1 Die Rolle des Nährstoffangebotes

Bakterien der Spezies *S. pyogenes* bilden *in vitro* Biofilme. Zumindest einige Indizien sprechen auch für ein *in vivo* Biofilmwachstum. Naheliegenderweise ist dies erforderlich, wenn die Bakterien nach einer Übertragung von Mensch zu Mensch auf durch andere Bakterien gebildete Biofilmstrukturen stoßen, die an menschlichen Ziel-Oberflächen aufgelagert sind. Weiterhin dient diese Eigenschaft im Rahmen von Monospezies-Biofilmen, in infiziertem menschlichen Gewebe zu persistieren. Deswegen ist es wichtig, die Struktur und Physiologie von *S. pyogenes* Biofilmen zu verstehen.

Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss ausgewählter Substanzen und verschiedener Umweltbedingungen auf die *S. pyogenes* Biofilmbildung des Serotyp M2-Stammes (typischerweise ein Hautinfektionskeim), M6-Stammes (typischerweise ein Tonsillitis-assoziiierter Keim) und M18-Stammes (ein Keim ohne besonderen Gewebetropismus) zu untersuchen.

Die Tabelle 9 gibt einen Überblick über alle im Rahmen dieser Arbeit getesteten Parameter und deren Einflüsse auf die Biofilmbildung für alle drei getesteten *S. pyogenes* Stämme.

Im Folgenden werden diese Ergebnisse detaillierter diskutiert.

**Tab. 9:** Überblick der getesteten Medien und Medienzusätze

Medium/ Testbedingungen	Biofilmbildung		
BHI Medium	M2	M6	M18
ohne Zusätze, pur	+	+	+
+ Glukose (Glc)	+++	+++	+++
+ Saccharose, Fruktose, Mannose	++	+++	+++
+ Glc, + Saliva	---	---	---
+ Glc, + Humanserum	---	---	++
+ Glc, + 10 µM FeCl <sub>3</sub>	++	++	++
+ Glc, Temperatur 30 °C	+	+	+++
+ Glc, anaerobe Inkubation	+++	++	++

CDM Medium			
ohne Zusätze, pur	---	+	---
+ Glc	+	+++	+
+ Saccharose, Fruktose, Mannose	---	++	---
+ Glc, + Saliva	---	+++	---
+ Glc, + Humanserum	---	---	+
THY Medium			
ohne Zusätze, pur	---	+	---
+ Glc	---	+	+
C-Medium			
ohne Zusätze, pur	---	++	---
+ Glc	---	+	---

Legende: (---) keine Biofilmbildung nachweisbar  
 (+) bis (+++) geringe bis ausgeprägte Biofilmbildung nachweisbar

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst der Einfluss verschiedener Kohlenstoffquellen (C-Quellen) untersucht. Dafür wurde die Biofilmbildung im BHI Medium unter Zusatz von vier verschiedenen Zuckern in unterschiedlichen Konzentrationen über einen Zeitraum von drei Tagen untersucht. Unter diesen Bedingungen konnten Veränderungen in der Biofilmarchitektur nachgewiesen werden. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass jeder der getesteten M-Serotyp-Stämme verschiedene C-Quellen zur Biofilmbildung favorisiert (s. Abb. 5).

Phosphotransferase-Systeme (PTS) stellen ein zentrales Kohlenhydrataufnahmesystem und Regulationsnetzwerk für Bakterien dar, mit deren Hilfe der bakterielle Stoffwechsel an veränderte Umweltbedingungen angepasst werden kann (63).

Der eigentliche Zuckertransport in die Zelle ist direkt an eine abwechselnd kaskadenartige Phosphorylierung und Dephosphorylierung der PTS-Enzyme gekoppelt. Zu dieser Kaskade gehören das EnzI (PEP-abhängige Histidinproteinkinase) sowie HPr (Histidin Protein) und der substratspezifische EnzII-Komplex, welcher je nach Zuckerspezifität aus drei (A,B,C) oder vier (A-D) Domänen bestehen kann. Nach der Übertragung des Phosphats auf das letzte Transmembranprotein wird anschließend der Zucker im eigentlichen Transportvorgang phosphoryliert. Die hierzu benötigte hochenergetische Phosphatbindung stammt aus dem durch die Glykolyse generiertem Phosphoenolpyruvat (PEP) (64, 65, 191, 231).

Eine allgemeine Übersicht des Zusammenspiels der verschiedenen Transportproteine des PT-Systems ist in der Abbildung 40 dargestellt.

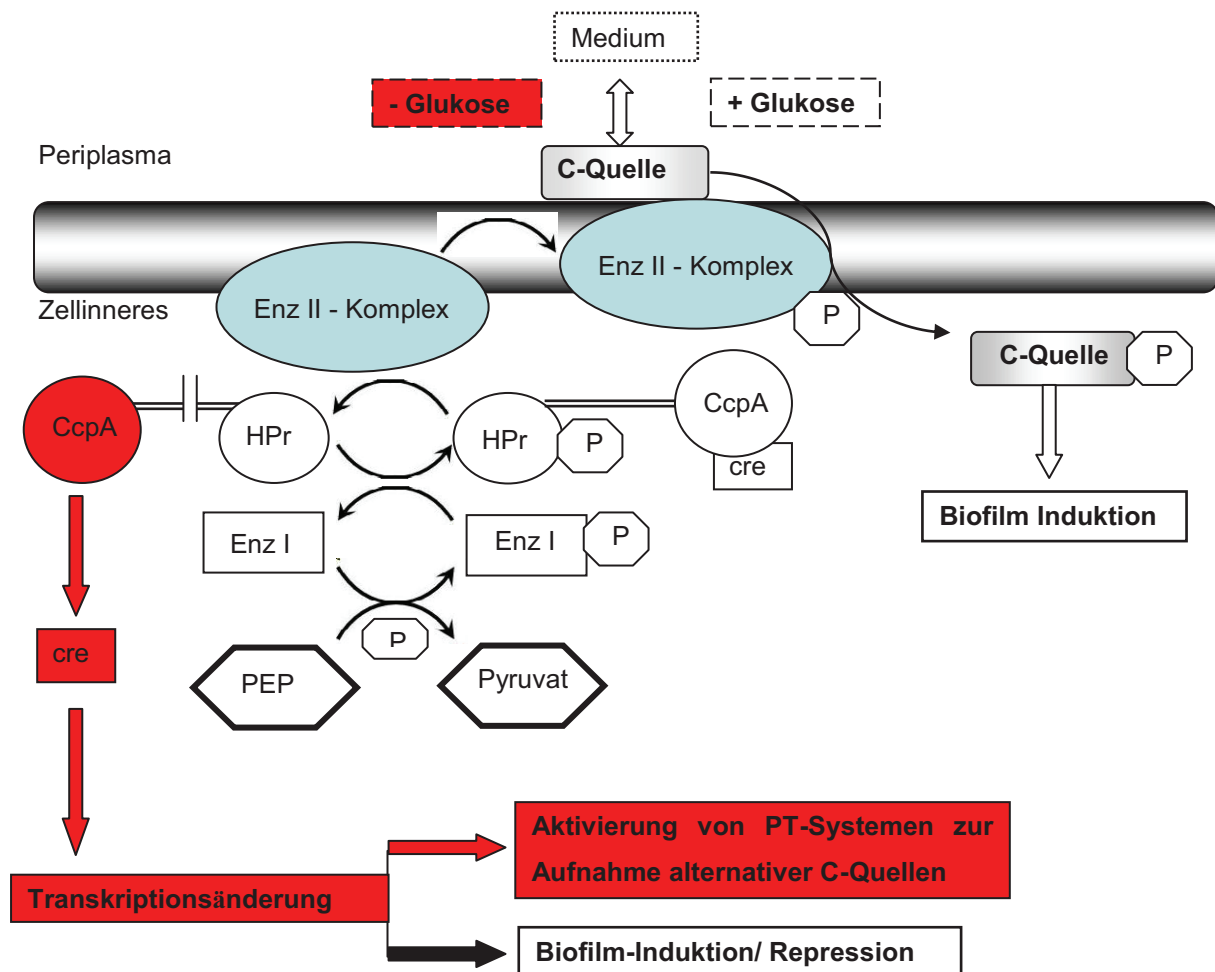


Abb. 40: Schematische Darstellung des PT-Systems zur Zuckeraufnahme. Während des Zuckertransportes erfolgt die Übertragung einer energiereichen Phosphatgruppe, die über verschiedene Enzyme (Enz I, HPr und Enz II-Komplex) ausgehend vom Phosphoenolpyruvat (PEP) übertragen wurde. Die allgemeinen Enzyme sind farblos hinterlegt, die Zucker-spezifischen Komponenten in hellblau dargestellt. Die rot unterlegten Vorgänge stellen mögliche Regulationsabläufe dar, wenn es zum Umschalten auf die Verwertung alternativer C-Quellen kommt, sobald keine Glukose verfügbar ist. Dabei erfolgen Bindungsänderungen des CcpA/cre Komplexes nach Ablösen vom dephosphorylierten HPr, wodurch cre freigesetzt wird und in der Zelle Transkriptionsänderungen hervorrufen kann (210).

Die zentralen Proteine für den transmembranen Zuckertransport sind für alle *S. pyogenes* Stämme einheitlich. Die in dieser Arbeit dargestellten Stamm-spezifischen Varianzen der Biofilmarchitektur in Gegenwart verschiedener C-Quellen deuten demnach auf eine individuelle Regulation der gesamten PTS-Expression bzw. einzelner Zuckermolekülspezifischer Proteine hin.



Für alle drei getesteten Stämme erwies sich Glukose in einem Anteil von 0,5 % im Medium als optimale Konzentration für die Biofilmbildung. Der konzentrationsabhängige Effekt des Zuckeranteils im Medium zeigte, dass das Glukose-spezifische PTS bzw. die zellinternen Glukose-verwertenden Enzyme bei *S. pyogenes* eine optimale Durchsatz- und Transportrate aufweisen.

An die Phosphorylierungszustände der PTS-Komponenten können Regulationsmechanismen wie die Steuerung des Energiestoffwechsels oder globale Regulatornetzwerke gekoppelt sein, wobei die Verfügbarkeit von C-Quellen im Medium bzw. der Umwelt ein entscheidendes Signal darstellen. Zu diesem Regulationsnetzwerk gehört auch die Steuerung via des CCR-Mechanismus (Carbon Catabolite Regulation) mit dem Carbon Catabolite Protein (CcpA) als zellinternen Sensor, wodurch eine Anpassung des *S. pyogenes* Zuckerstoffwechsels auf andere C-Quellen erfolgen kann, sobald keine Glukose in der Umgebung bzw. im Medium verfügbar ist (7, 137, 210). Damit stellen PT-Systeme sowohl ein wichtiges Zucker- als auch Signalaufnahmesystem u. a. auch für das Wachstum im Biofilm dar (224).

Vor diesem Hintergrund ist für den *S. pyogenes* Serotyp M6-Stamm eine Zucker-abhängige Regulation in der Biofilmbildung eher unwahrscheinlich, da dieser Stamm bei nahezu allen getesteten C-Quellen und Kulturmedien einen Biofilm ausbildete. Demgegenüber muss bei den beiden Stämmen der Serotypen M2 und M18 eine PTS-Regulation der Biofilmbildung vorhanden sein, da infolge der Verfügbarkeit verschiedener C-Quellen und die Inkubation in unterschiedlichen Medien es zu sichtbaren Schwankungen in der Biofilmbildung gekommen ist.

Diese Befunde gehen einher mit verschiedenen Studien, in denen berichtet wird, dass der Zusatz von Glukose die Bildung von *E. faecalis*-Biofilmen induzieren und durch Saccharose inhibiert werden kann. Auch die Wahl des Kulturmediums ist von entscheidender Bedeutung für die Ausprägung von Biofilmen (148, 155, 181, 182). Zudem zeigten Studien mit oralen Biofilm-bildenden Bakterien, dass das Vorhandensein von Saccharose im Kulturmedium eine Erhöhung der EPS-Matrix Produktion verursacht (255).

Houot und Watnick (106) haben gezeigt, dass eine Inaktivierung eines der PT-Systeme das Wachstum von *Vibrio cholerae*-Biofilmzellen in Abhängigkeit von der jeweiligen C-Quelle inhibieren kann.

Denkbar wäre hier, dass mit Hilfe von PTS-Komponentendefizienten *S. pyogenes* Stämmen die Rolle des PT-Systems für die Biofilmbildung näher charakterisiert werden kann.

Ausgehend von den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass sowohl das BHI Medium als auch Glukose optimale Bedingungen für die *S. pyogenes* Biofilmbildung darstellen.

#### 4.1.2 Einfluss verschiedener Mediumzusätze, Temperatur und Sauerstoff

In den vorliegenden Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die Stämme der Serotypen M2 und M18 in Gegenwart von Saliva sowohl in BHI als auch in CDM als Kulturmedium in ihrer Fähigkeit Biofilme zu bilden, gehemmt wurden (s. Abb. 8, 9). Für den Serotyp M6-Stamm konnte allerdings in CDM Medium mit Saliva Zusatz eine hohe Biofilmmasse nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse korrelieren mit Beobachtungen aus anderen Studien, in denen festgestellt wurde, dass das M-Protein von *S. pyogenes* eine Bindung mit dem in Saliva enthaltenem Mucin eingehen kann (197). Sie stellten anhand verschiedener Mucin-Bindungsassays fest, dass die Mucin-Strukturkomponente Sialinsäure insbesondere die Adhärenz von *S. pyogenes* an Epithelzelloberflächen verhindern kann. Spezifische Rezeptormoleküle am M-Protein können an Sialinsäurestrukturen binden, so dass die Adhärenz von *S. pyogenes* an Epithelzelloberflächen damit verhindert wird.

Da sowohl die eigenen Ergebnisse als auch Literaturdaten eine zentrale Funktion des M-Proteins zumindest in einigen Serotypen für die Oberflächenbindung der Bakterien nahelegen (39, 136), kann Mucin für die anschließende Bildung von Mikrokolonien womöglich auf diesem Weg mit der Biofilmbildung interferieren (84, 85). Beim Serotyp M6-Stamm scheint es keine Interaktionen zwischen M-Protein und Mucin geben, so daß bei diesem Stamm Mucin keine Wirkung auf die Biofilmbildung hat.

Die Fähigkeit von Mikroorganismen an Oberflächen anheften zu können, ist durch Faktoren wie Oberflächenbeschaffenheit, Osmolarität, Verfügbarkeit von Metallionen und Sauerstoff sowie der Temperatur beeinflusst (45, 47, 61). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der Einfluss von Eisenionen, die Verfügbarkeit von Sauerstoff sowie die Veränderung der Temperatur auf die *S. pyogenes* Biofilmbildung untersucht.

Bei der Messung des Einflusses verschiedener Eisenkonzentrationen auf die initiale Biofilmbildung reagierten alle drei Stämme bei 1 mM Eisen schon nach 24 Stunden mit einer stark verringerten Bildung von Mikrokolonien. Über den gesamten Zeitraum von drei Tagen erfolgte keine weitere Reifung der primären Biofilmzellmasse. Bereits ab einer Konzentration von 100 µM wurden für die Stämme der Serotypen M2 und M6 eine verringerte Biofilmbildung beobachtet, in diesem Fall aber eine nachweisliche Biofilmreifung noch nach 72 Stunden erfolgte (s. Abb. 13).



Es ist bekannt, dass überschüssiges Eisen in der Bakterienzelle toxische Effekte hervorrufen kann, denn in weiteren Arbeiten wurde bereits die zellschädigende Wirkung von hohen Eisenkonzentrationen auf *P. aeruginosa* bzw. *S. aureus* Biofilme beschrieben (113, 254). Denkbar wäre hier, dass durch Adsorption von Eisenionen aus dem Medium an die Oberflächenpolymere die Struktur als auch die Hydrophobizität der Bakterienoberfläche sich verändert und die Bindungseigenschaften der *S. pyogenes* Zellen an das Substratum vermindert (53, 69).

Das Überleben humanpathogener Bakterien ist abhängig von deren Fähigkeit, sich an verändernde Umgebungsbedingungen anzupassen. *S. pyogenes* als Besiedler der oberen Schleimhautareale kann über Verletzungen in tiefer gelegene Gewebsschichten gelangen und dort schwere Infektionen verursachen. Dafür muss sich *S. pyogenes* sowohl an ein mikroaerophiles bis hin zum anaeroben Milieu als auch an geringere Temperaturen adaptieren können (28, 86). Dies erfordert eine organisierte Regulation aller metabolischen und physiologischen Prozesse, die das Überleben des Bakteriums ermöglichen.

Inwiefern sich diese Veränderungen auf die *S. pyogenes* Biofilmbildung auswirken, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Die Stämme wurden dafür bei 30 °C (im Vergleich zu 37 °C) inkubiert und auf ihre Fähigkeit zur Biofilmbildung hin untersucht. Es zeigten sich deutliche Serotyp-spezifische Unterschiede in der Biofilmentwicklung, wobei jedoch kein Einfluss auf die Vitalität der im Biofilm enthaltenen Bakterien nachweisbar war (s. Abb. 15). Über den gesamten Versuchsverlauf war die Biofilmbildung von den Stämmen der Serotypen M2 und M6 bei 30 °C deutlich geringer als bei 37 °C. Der Serotyp M18-Stamm hingegen konnte auch bei 30 °C starke Biofilme bilden. Die Biofilmbildung ist demzufolge nur bei einigen *S. pyogenes* Serotypen temperaturabhängig.

So ließe sich auf der Basis der experimentellen Ergebnisse eine reduzierte Biofilmbildung des *S. pyogenes* Serotyp M2-Stammes bei akuten Hautinfektionen (geringere Umgebungstemperatur) gegenüber der Körperkerntemperatur vorhersagen. Wenn es denn, wie von Akiyama *et al.* (2) beschrieben, zu einer Biofilmbildung bei Hautinfektion kommt, könnte dies erst in einem späteren Infektionsstadium kommen.

In Genexpressionsstudien mit *S. pyogenes* konnte gezeigt werden, dass insbesondere Gene für Hämolyisin- und Eisentransportproteine sowie die Regulation der Eisen-Homöostase bei 29 °C im Vergleich zu 37 °C hochreguliert werden (213). Eine verminderte Expression konnte bei Genen beobachtet werden, die für Proteine des Zellwandsynthese, Zellteilung sowie dem Fettsäure- und Phospholipid-Metabolismus kodieren. Diese Daten suggerieren die wichtige

Rolle dieser Proteine bei Wachstum von *S. pyogenes* unter geringen Temperaturen. Eine temperaturabhängige Expression dieser Proteine während des Biofilmwachstums sollte daher in nachfolgenden Arbeiten auf Transkriptionsebene weiter untersucht werden.

Ein weiterer wichtiger Umweltfaktor, auf den sich *S. pyogenes* während der Infektionsphasen einstellen muss, ist die Verfügbarkeit von Sauerstoff. Je nach Infektionsort wird *S. pyogenes* mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen konfrontiert. Die in dieser Arbeit untersuchten *S. pyogenes* Serotyp-Stämme wurden auf ihre Fähigkeit zur Biofilmbildung unter anaeroben Bedingungen getestet. Die Resultate zeigen auch hier Serotyp-spezifische Effekte (s. Abb. 17).

Unter anaeroben Bedingungen in BHI + 0,5 % Glukose konnte hauptsächlich nur der Serotyp M2-Stamm nachweislich stärkere Biofilme bilden als unter aerober Atmosphäre. Diese Resultate deuten darauf hin, dass während des Infektionsprozesses dieses Serotyps eher im Körperinneren als auf der Hautoberfläche dieser mit einer Ausbildung von Biofilmstrukturen assoziiert sein kann. Für alle weiteren in dieser Arbeit getesteten Stämme spielt der Sauerstoff-Aspekt zur Ausbildung von Biofilmen keine Rolle.

## 4.2 Bedeutung von Virulenzfaktoren für die Biofilmbildung

Es wurden bereits für einige Bakterien Zusammenhänge zwischen der Expression von Virulenzgenen und der Biofilmbildung beschrieben. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Virulenzfaktor-Insertionsmutanten des Serotyp M2-Stammes auf ihre Biofilmbildung hin untersucht (s. Abb. 18).

Für die Insertionsmutanten der Dipeptidpermease (*dpp*), Cysteinprotease (*speB*) und des Transkriptionsregulators Mga (*mga*) konnten verringerte Biofilmmassen detektiert und morphologisch bestätigt werden. Für *S. pyogenes* wurden sowohl Di- als auch Oligopeptidpermease- (Dpp, Opp) Systeme beschrieben, die an den Prozess der bakteriellen Adhärenz beteiligt sein können (185, 186, 242). Hinweise darauf geben auch die Untersuchungen mit *S. pneumoniae*, bei dem der Export wichtiger Oberflächenproteine zur Adhärenz an eukaryotische Zellstrukturen bzw. die Signale zur Produktion von weiteren Adhäsinen mittels solcher Transportsysteme vermittelt werden (55). Ein weiterer Virulenzfaktor, der neben der Dipeptidpermease eine Rolle in der *S. pyogenes* Biofilmbildung spielen könnte, ist die Cysteinprotease SpeB. SpeB ist eine sezernierte, aktive Protease mit Beteiligung an der Wirtszelladhärenz- und Internalisierung bei Hautinfektionen. Die Protease vermittelt Interaktionen zur Bindung Wirtszell-spezifischer Oberflächenproteine wie Laminin sowie anderen Glykoproteinen (108). Die Inaktivierung kann somit ein verändertes Bindungsverhalten von *S. pyogenes* hervorrufen.

Für die *speB*-Mutante wurde im Rahmen dieser Arbeit eine verringerte Biofilmbildung und -entwicklung detektiert. Diese Ergebnisse können auf eine potentiell wichtige positive Funktion von SpeB sowohl für die initiale Bindung als auch für die spätere Biofilmbildung zurückzuführen sein. In anderen Studien wurde gezeigt, dass SpeB die Ausbildung von Biofilmstrukturen auch negativ beeinflussen kann (67, 146, 225). Diese Daten korrelieren nicht mit den vorliegenden Ergebnissen in dieser Arbeit, da hier die Inaktivierung eine deutliche Verminderung in der Ausbildung von Mikrokolonien sowie der Biofilmentwicklung zur Folge hatte.

In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass SpeB eine Degradation von Protein F2 in der stationären Phase hervorruft und dadurch die Bindungskapazität an Oberflächen vermindert (141). Zudem ist bekannt, dass SpeB spezifisch Fragmente von der M- und H-Proteinfamilie auf der *S. pyogenes* Oberfläche abspalten kann, wodurch ein verändertes Bindungsverhalten auftreten kann (17). Dies könnte zu einem kontrollierten Ablösen von Zellen aus dem Biofilmverband zur erneuten Besiedlung neuer nährstoffreicher Standorte führen.

Mga ist ein Stand-Alone-Regulator, der autoreguliert (105, 192) und in ein Wachstumsphasen-abhängiges Regulationsnetzwerk eingebunden ist. Die Mehrheit aller Mga regulierten Virulenzgene kodieren für Zellwand-assoziierte Oberflächenmoleküle (M-Proteinfamilie, die Fibronektin- und Kollagen-bindenden Proteine), die für die Adhärenz an und Internalisierung in eukaryotische Zellen verantwortlich sind (105).

Cho und Chaparon (39) zeigten, dass Mga als Positivregulator des M-Proteins essentiell für die Biofilmbildung ist. Mit diesen Untersuchungen und in Übereinstimmung mit den hier erhaltenen Daten von der *mga*-Mutante konnte gezeigt werden, dass bei Inaktivierung des zentralen Regulators wichtige Prozesse wie Zelladhäsion und Mikrokoloniebildung von den Bakterien nicht mehr spezifisch gesteuert und an die jeweiligen Umweltbedingungen angepasst werden können (32, 146, 154, 160).

Das M-Protein (*emm*) und die Kapsel (*has*) scheinen keinen direkten Einfluss auf die initiale Biofilmentwicklung des *S. pyogenes* Serotyp M2-Stammes zu haben. Die Ergebnisse der *emm*-Mutante zeigen, dass die initiale Bindung der Bakterienzellen an Oberflächen demnach auch durch andere Proteine erfolgen muss. Neben dem M-Protein verfügt *S. pyogenes* über Oberflächenproteine, den MSCRAMMs („microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“) die einer gemeinsamen Proteinfamilie angehören. Diese binden wirtseigene Matrixproteine, wie z. B. Fibronektin, Fibrinogen, Kollagen, Laminin sowie Heparin-ähnliche Proteine (175, 176).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit der *has*-Mutante des Serotyp M2-Stammes eine verminderte Biofilmentwicklung in der späteren Reifephase nachgewiesen werden. Hier kann spekuliert werden, dass die Kapsel keine entscheidende Rolle für die initiale Entstehung, jedoch für die spätere Entwicklung und Reifung von Biofilmen spielt (39). Dies deutet auf eine Rolle der Kapsel in der Persistenz von Steptokokken hin, welche zusätzlich als Schutz vor Komplementaktivität der Wirtsimmunabwehr dient (56).

Die Ergebnisse legen nahe, dass Virulenzfaktoren für die *S. pyogenes* Biofilmbildung von entscheidender Bedeutung sind und abhängig vom jeweiligen Virulenzgen unterschiedliche Effekte hervorrufen können. Weiterführende Transkriptomstudien könnten demnach wichtige Informationen zur Expression und ggf. auch Funktion essentieller Virulenzfaktoren während der Biofilmbildung von *S. pyogenes* liefern.

### 4.3 Nachweis extrazellulärer Substanzen in der Biofilmmatrix

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Fokus hauptsächlich auf den Nachweis von Proteinen und Nukleinsäuren gelegt. Diese Komponenten werden als wichtige Strukturen beschrieben, die für die Stabilität und Struktur sowie für die Zell-Zell-Kommunikation von Bedeutung sind (178, 217, 247).

Es sollte zudem das Vorhandensein und der Nachweis von extrazellulärer DNA (eDNA) in *S. pyogenes* Biofilmen herausgearbeitet werden. Mit Hilfe von DNase I wurden zwei verschiedene Konzentrationen des DNA-degradierenden Enzyms sowohl auf die initiale Biofilmentstehung als auch auf prä-inkubierte Biofilme getestet. Alle drei *S. pyogenes* Stämme zeigten eine Verminderung in der Biofilmbildung und -stabilität in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration (s. Abb. 21). Mit diesen Daten konnte gezeigt werden, dass eDNA sowohl für die initiale Bildung als auch für die Stabilität von *S. pyogenes* Biofilmen verantwortlich ist.

In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eDNA an der initialen Biofilmbildung beteiligt ist (190, 247). Diese Aussagen gehen einher mit den Ergebnissen, die im Rahmen dieser Arbeit erhalten wurden. Innerhalb der getesteten Serotypen konnten allerdings Unterschiede beobachtet werden. Während die Ergebnisse von den Stämmen der Serotypen M2 und M18 auf eine Rolle der eDNA für die Biofilmbildung- und -stabilität hindeuten, zeigte sich für den Serotyp M6-Stamm keine Beeinflussung.

Der Effekt von DNase I auf prä-inkubierte Biofilme konnte sehr deutlich bei drei Tage alten Biofilmen beobachtet werden. Hier kam es zu einer EPS-Abnahme nach der Enzymbehandlung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Diese Ergebnisse korrelieren mit Aussagen von Whitchurch *et al.* (247), dass eDNA essentiell für bereits bestehende Biofilmstrukturen in der frühen Reifungsphase ist.

Anhand der Ergebnisse der durchgeführten Wachstumskinetiken resultiert noch die Frage, ob ein direkter Einfluss von DNase I auf die Bakterienzellen besteht. Versuche mit DNase I-behandelten planktonischen *S. pyogenes* Zellen zeigen, dass das Zellwachstum bei höheren Konzentrationen ab 90 U/ml im Vergleich zu unbehandelten Zellen stark verlangsamt bzw. unterdrückt werden kann.

Diese Kontroversen lassen die Annahme zu, dass der Einsatz von degradierenden Enzymen eine vielfältige Auswirkung auf Bakterienzellen ausüben können und mit Vorsicht in Interpretationsanalysen der Biofilm-DNase-Expositionsexperimente betrachtet werden sollten.

Bakterien verfügen über eine Zell-Zell-Kommunikation, die unter dem Begriff Quorum sensing (QS) bekannt ist. QS ist ein Mechanismus, bei dem die bakterielle Zelldichte und zellulären Prozesse mittels bestimmter Botenstoffe detektiert und kontrolliert werden können. Prozesse der Virulenz, Kompetenz, Produktion antimikrobieller Substanzen, Sporulation oder die Biofilmbildung werden durch QS gesteuert (14, 60, 194).

Biofilm-bildende Streptokokken kommunizieren untereinander durch kleine, sezernierte Peptid-Signalmoleküle, welche eine entscheidende Bedeutung für die Biofilmbildung haben (121, 140, 178, 222). Für die *S. pyogenes* Stämme der Serotypen M14 und M18 ist ein Zwei-Komponentensystem, der sogenannte Sil Lokus („*streptococcal invasion locus*“) beschrieben. Dieser weist starke Homologien zum QS Kompetenz-Regulator von *S. pneumoniae* auf und ist u. a. an der Invasivität, der Biofilmbildung und dem DNA-Transfer beteiligt (71, 100, 118).

Über die Bedeutung von DNA Aufnahme- und Abgabesysteme während der Biofilmbildung wurde wiederholt berichtet. Petersen *et al.* (178) beschreiben verschiedene Systeme, die sowohl in Gram-positiven als auch Gram-negativen Bakterien für den DNA-Transfer verantwortlich sein können. Untersuchungen von *S. pyogenes* zeigen, dass Pilus-Strukturen die Zelladhärenz vermitteln und somit an der Biofilmbildung beteiligt sind. Daher kann spekuliert werden, dass eine potentielle Bindung von eDNA über Pili im Biofilm vermittelt werden kann (149, 158).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, mit Hilfe von Proteinase K in verschiedenen Konzentrationen bereits etablierte Biofilmstrukturen zu beeinflussen. Die Resultate implizieren, dass schon eine geringe Konzentration von 1 µg/ml Enzym eine Abnahme der Biofilmmasse zur Folge hatte (s. Abb. 23). Zudem wurde eine höhere Sensitivität von älteren *S. pyogenes* Biofilmen beobachtet. Insbesondere die erhaltenen Daten für den *S. pyogenes* Serotyp M2-Stamm deuten darauf hin, dass aufgrund der starken Reduktion der Biofilmmasse die EPS einen hohen Proteinanteil aufweist.

Bei Staphylokokken-Biofilmen wurde die Spezifität unterschiedlich wirkender Enzyme auf die EPS gezeigt (34, 83). Deren EPS-Hauptkomponente ist ein Poly-N-acetylglucosamin (PNAG), das für die Biofilmbildung und -akkumulation sowie bei der Abwehr von Immunzellen des Wirtes eine wichtige Rolle spielt. Verschiedene Studien zeigten, dass die EPS von PNAG-negativen Biofilmen im Vergleich zu den PNAG-haltigen Biofilmen durch Proteasen fast vollständig abgelöst wurde. Von Interesse wäre, wie sich die Stabilität der *S. pyogenes* Biofilme nach Behandlung mit Polysaccharid-spaltenden Enzymen verhält.



Demnach können in zukünftigen Studien mit Hilfe molekularbiologischer Untersuchungen neue Erkenntnisse über die Funktion und Rolle von Genen für die *S. pyogenes* Matrixbildung gewonnen werden. Auf diese Weise konnten z. B. bestimmte Regulationsmechanismen für die PNAG-Synthese bei Staphylokokken oder die Alginat-Synthese bei Pseudomonaden sowie die Rolle von QS-Molekülen für den Abbau von Biofilmen unter nährstofflimitierenden Bedingungen nachgewiesen werden (22, 83, 147).

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse verdeutlichen, dass Polysaccharide eine entscheidende Rolle für die *S. pyogenes* Biofilmstabilität spielen können. Die Arbeitsgruppe von Doern *et al.* (67) unterstützt mit ihren Untersuchungen die hier zugrunde liegende Arbeitshypothese und die erhaltenen Ergebnisse, dass die *S. pyogenes* Biofilmbildung und -stabilität von Protein- und eDNA Komponenten vermittelt wird, jedoch ein Großteil der Matrix aus Polysacchariden besteht.

Die Charakterisierung der Biofilmmatrix kann ebenso unter Verwendung mikroskopischer Methoden erfolgen. Die Proteinstrukturen der EPS vieler Biofilm-lebender Bakterien sind mit Zuckerkomponenten assoziiert (Glykoproteine) und können demzufolge mit Lektinen markiert werden, da sie spezifisch an verschiedene Zuckerkonjugate binden (163, 164).

Die Kombination von *S. pyogenes* spezifischen Antikörpern mit Lektinen ermöglichte einen ersten Nachweis von potentiellen Zuckerstrukturen innerhalb der Biofilmmatrix. Exemplarisch konnten für die Stämme der Serotypen M2 und M18 EPS-Komponenten angefärbt und dargestellt werden (s. Abb. 27). Die Kombination von WGA-TexasRed und dem Lebendfarbstoff Syto 9 (grün) zeigte deutlich, dass hier N-acetylglucosamin- (NAcGlc)<sub>2</sub> Strukturen vorkommen. Ähnliche Ergebnisse konnten mit dem Concanavalin A und PHA erhalten werden. In anderen Studien wurde die Nutzung von WGA zur erfolgreichen Darstellung von PNAG-Substanzen in der Staphylokokken Matrix beschrieben (83). Dies lässt Annahmen zu, dass auch die *S. pyogenes* Matrix PNAG-ähnliche Strukturen enthalten kann.

Abschließend können aus den Ergebnissen einige Aussagen gefolgert werden. Sowohl mit Enzymversuchen unter Verwendung der Proteinase K und DNase I als auch fluoreszenzmikroskopischen Techniken konnte gezeigt werden, dass die *S. pyogenes* Biofilmmatrix sich aus extrazellulärer DNA sowie verschiedenen Zuckerstrukturen und bisher noch nicht näher charakterisierten Polysacchariden zusammensetzt. Der Mechanismus der Freisetzung, die Menge an eDNA und die direkte Identifizierung von Proteinen der *S. pyogenes* Biofilmmatrix sollten daher Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

#### 4.4 Charakterisierung eines *S. pyogenes* Biofilm-spezifischen Phänotyps

Bakterien im Biofilm sind in der Lage, über Monate bis Jahre hinweg mit Hilfe spezieller Anpassungsmechanismen extreme Umweltbedingungen zu überdauern (58, 96). Das stationäre Leben der im Biofilm-lebenden Bakterien ist einer ständigen Stresssituation ausgesetzt, die zu Änderungen in der Expression und Regulation bestimmter Gene führen können (45, 139).

Hält dieser stationäre Zustand über einen längeren Zeitraum an, kann es zum Verlust der Kultivierbarkeit der Zellen kommen. Dieser Zustand ist unter dem Begriff „*viable but non culturable*“ (VBNC) bekannt, bei dem die Zellen nicht mehr zur Zellteilung fähig aber trotzdem lebendig sind. Es existieren 3 Theorien zur Erklärung des VBNC-Phänomens. Die Zellen verlieren ihre Kultivierbarkeit I) durch unspezifische Degradationen aufgrund des Alterns, II) aufgrund veränderter genregulatorischer Mechanismen für den Eintritt in den VBNC-Status und das Verlassen desselben oder III) durch Induktion spezifischer Mechanismen zur Adaption an veränderte Umweltbedingungen, die vergleichbar mit der Sporenbildung Gram-positiver Bakterien sind (166, 167, 193).

VBNC-Bakterien stellen ein großes Gesundheitsrisiko dar, da viele pathogene Spezies wie *V. cholerae*, *V. vulnificus* oder *E. coli* aufgrund ihres VBNC-Charakters mittels typischer diagnostischer Nachweistechiken nicht detektiert werden, sich aber unter für sie günstigen Bedingungen wiederbeleben lassen und dann Infektionen auslösen können.

##### 4.4.1 pH-Induktion der *S. pyogenes* Biofilmbildung als Stress-Antwort

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich die Physiologie der *S. pyogenes* Biofilmzellen über einen definierten Zeitraum von insgesamt zehn Tagen in statischer Kultur ohne Zufuhr neuer Nährstoffe verhält. Dazu wurden die Biofilmmasse, Zellzahlen und der pH-Wert des Mediums unter Standardbedingungen bestimmt.

Die Resultate zeigen, dass bei allen Stämmen nach 16 Stunden der Beginn der Biofilmbildung unter Standardbedingungen mit einer parallelen Abnahme des pH-Wertes von 7,3 auf etwa 4,8 einherging. Im Verlauf der Inkubation stieg die Biofilmmasse bei den Stämmen der Serotypen M2 und M6 nach fünf bzw. sieben Tagen auf ihr Maximum, hingegen der Serotyp M18-Stamm erst nach 8 Tagen das Maximum an Biofilmmasse erreichte. Bei allen drei Stämmen veränderte sich die Biofilmmasse für die übrige Inkubationszeit nicht weiter. Erst

nach zehn Tagen konnte eine geringfügige Abnahme beobachtet werden, was auf einer teilweisen Ablösung von schwach gebundenen Biofilmzellen zurückzuführen ist.

Aufgrund der hier dargestellten Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass der pH-Wert als zentraler Induktor für die *S. pyogenes* Biofilmbildung agiert. *S. pyogenes* gehört zur Ordnung der Milchsäurebakterien und setzt als homofermentativer Keim Glukose überwiegend in Laktat um. Diese Reaktion ist für die Erniedrigung des pH-Wertes im Medium verantwortlich (36, 56). Nach 24 Stunden Inkubation in BHI Medium auch ohne weitere Supplementierung von Glukose sank hier der  $\text{pH} < 6$ .

Die in dieser Arbeit generierten Daten und Fluoreszenzaufnahmen (s. Abb. 29 bis 31) zeigen eindeutig, dass ein pH-Wert von unter 6,0 die *S. pyogenes* Biofilmbildung induzieren kann (49). So wurde die Bildung von Mikrokolonien und Produktion von Biofilmmasse etwa nach sechs Stunden bei einem pH-Wert von 5,2 induziert und nach 24 Stunden lag ein dichter Biofilmverband vor (s. Abb. 31).

Die Rolle des externen pH-Wertes für die Ausbildung von Biofilmen wurde ebenfalls in Studien mit anderen Biofilm-bildenden Bakterien beschrieben (169). Die Ergebnisse aus dieser Studie deuten auf eine Form der „Glukose-Induktion“ der Biofilmbildung hin. Infolge der Zugabe des Zuckers kam es zu einem Absinken des pH-Wertes, der die Biofilmbildung induzierte. Weitere Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe zeigten, dass ein initialer pH-Wert zwischen 5,5 und 6,5 die Bildung von Biofilmmasse stimulieren kann.

Anders als in den anderen Arbeiten konnte anhand der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse gezeigt werden, dass *S. pyogenes* nur bei einem initialen pH-Wert von 7 bzw. 7,5 an eine Oberfläche bindet und anschließend nach pH-Wert Erniedrigung Biofilme bildet (s. Abb. 30). Dementsprechend kommt der externen pH-Wert Änderung eine Schlüsselrolle bei der induzierten Biofilmbildung von *S. pyogenes* zu. Diese „Säure-Induktion“ der *S. pyogenes* Biofilmbildung könnte demnach auf die physiologischen Voraussetzungen bei der Kolonisierung des Erregers zurückzuführen sein. Die Hautoberflächen bzw. des Nasen- und Rachenraumes weisen im Stadium der Kolonisierung pH-Werte  $\geq 7$  auf und niedrige Werte im Rahmen der späteren Infektion.

#### 4.4.2 Nachweis eines VBNC-ähnlichen Zustandes von *S. pyogenes* Biofilmzellen in Langzeitkultur

Die Biofilmbildung ist als eine Form der Anpassungsfähigkeit von Bakterien zum Überleben extremer Umgebungsbedingungen bekannt (139, 144, 167). Dabei können diese in einen Zustand wechseln, der als „*viable but non culturable*“ (VBNC) bekannt ist. Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob *S. pyogenes* Biofilmzellen während einer Langzeitkultivierung solchen physiologischen Veränderungen unterliegen und welche Faktoren einen potentiellen VBNC-Zustand im Biofilm-spezifischen Phänotyp induzieren können.

Für diese Annahme wurden parallel zur Biofilmmasse- und pH-Wertbestimmung die Gesamt- und Lebendkeimzahlen (GZZ, LKZ) des Biofilms bestimmt. Überraschenderweise konnte unter Standardbedingungen in BHI Medium mit und ohne Zusatz von Glukose ein VBNC-ähnlicher Status aller untersuchten Stämme detektiert werden (s. Abb. 32). Bei externer Zugabe von Glukose konnte bereits nach drei Tagen für keinen der drei Stämme eine meßbare LKZ nachgewiesen werden. Konträr dazu bildeten die Kulturen in BHI Medium ohne Glukose erst nach vier bis fünf Tagen keine Kolonien mehr auf festem Nährboden. Die GZZ blieb während des Inkubationszeitraumes von zehn Tagen relativ konstant. Außerdem wurden insgesamt mehr GZZ unter Glukosezusatz detektiert, wodurch sich auch die höheren Biofilmmassen erklären lassen können.

Wie in den vorigen Untersuchungen belegt werden konnte, spielt die Verringerung des externen pH-Wertes unter 6,0 im Medium eine entscheidende Rolle für die Biofilmbildung. Es wurde außerdem ein VBNC-ähnlicher Zustand bei den Biofilmzellen in Abhängigkeit vom pH-Wert des Kulturmediums beobachtet. Sobald sich dieser einem Wert  $\leq 5,5$  annäherte, wechselten die Bakterienzellen in diese Lebensform über, die das Überleben der Bakterien in stationären Langzeitkulturen sichern kann (169, 250).

Nun stellt sich die Frage, ob auch diese Veränderung weiterer Umgebungsbedingungen den VBNC-ähnlichen Status induzieren kann. Der Verlust der Kultivierbarkeit von Biofilmzellen als typisches Kriterium der VBNC-Form bei niedrigen Temperaturen wurde erst später als bei höheren Inkubationstemperaturen detektiert, dies aber auf ein verlangsamtes Wachstum der Bakterien unter diesen Bedingungen zurückzuführen war (s. Abb. 34). Selbst bei Sauerstoffmangel wechselten die Biofilmzellen in einen VBNC-ähnlichen Zustand nach drei Tagen Inkubation, analog den Ergebnissen unter Standardbedingungen. Demzufolge müssen andere Faktoren für die „VBNC“-Induktion in *S. pyogenes* Biofilmzellen verantwortlich sein.

Desweiteren wurde die *S. pyogenes* Biofilmbildung als möglicher Induktor des VBNC-ähnlichen Zustandes von Biofilmzellen untersucht (s. Abb. 35). Die Resultate deuten darauf hin, dass keine direkte Verbindung zwischen der *S. pyogenes* Biofilmbildung und einem VBNC-ähnlichen Status besteht.

So blieb als einziger mit dem VBNC-Status assoziierter Parameter der pH-Wert, der zudem auch für die Induktion der Biofilmbildung verantwortlich ist.

Bei planktonischen *S. pyogenes* Zellen wurde beschrieben, dass bis zu 99,9 % der Zellen ihre Kultivierbarkeit nach vier bis sechs Tagen unter verschiedenen Stress- und Hungersituationen verloren (233). Die Autoren zeigten, dass alternativ zur Glukose auch Aminosäuren als essentielle C-Quellen für das Überleben in Langzeitkulturen dienen können (35). Besonders die Limitierung von C-Quellen kann eine erhöhte Überlebensfähigkeit in Gram-positiven Bakterien zur Folge haben, während ein Stickstoff- oder Phosphatmangel den VBNC-Status schneller induzieren (92, 244).

Im Rahmen der Untersuchungen über einen potentiellen *S. pyogenes* VBNC-Status von langzeitkultivierten Biofilmzellen wurde gezeigt, dass mit Beginn der VBNC-ähnlichen Lebensphase die Herabsetzung der Aktivität des Schlüsselenzyms, die Laktat-Dehydrogenase (LDH) von *S. pyogenes* einhergeht (s. Abb. 38).

Die LDH reduziert am Ende der Glykolyse Pyruvat zu Laktat. Dabei wird durch Oxidation von  $\text{NADH}^+$  das wichtige Koenzym  $\text{NAD}^+$  regeneriert und somit ein Redox-Gleichgewicht geschaffen. Womöglich sind diese Beobachtungen auf eine Anpassung an den Nährstoffmangel in der stationären Lebensform zurückzuführen.

Eine Überlebensstrategie von *S. pyogenes* Biofilmzellen in Langzeitkulturen könnte darin liegen, dass es zu einem möglichen Wechsel vom homo- zum heterofermentativen Stoffwechsel kommt. Dabei wird Pyruvat unter ATP Bildung zu Ethanol, Acetat und Formiat umgesetzt (37). Die Arbeitsgruppe um Hols *et al.* zeigte (104), dass ein LDH-negativer Stamm von *Lactococcus lactis* Pyruvat direkt zu Formiat, Ethanol und Acetat als „Rettungsweg für das Redox-Gleichgewicht“ umsetzte. Unter Sauerstoff- und Glukosemangel zeigten LDH-Mutanten von *L. lactis* einen Shift zur Mischsäuregärung, wobei auch das  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  Verhältnis einen Einfluss auf die Verzweigung von homo- oder heterofermentativer Stoffwechsel hat (90, 165). Zudem konnte eine Verringerung der LDH-Transkriptionsrate in Verbindung mit der Hochregulation des NOXase Genes (NADH-Oxidase) beschrieben werden (37).

Diese Erkenntnisse lassen die Vermutung zu, dass bei *S. pyogenes* Biofilmzellen im potentiellen VBNC-Status die NADH-Oxidase die Regeneration des NAD<sup>+</sup> für die Glykolyse übernimmt und somit das Redox-Gleichgewicht der Bakterienzelle aufrechterhalten kann.

Eine valide Aussage über einen potentiellen VBNC-Status von *S. pyogenes* Biofilmzellen lässt sich alleine aus diesen Daten nicht ableiten. Ziele einer Weiterführung der begonnenen Untersuchungen von VBNC-ähnlichen *S. pyogenes* Biofilmzellen könnte der Nachweis von metabolisch und genexpressions-aktiven Zellen sein, wie sie bereits für andere Biofilmbildende Bakterien gezeigt wurden (142, 143).

#### 4.4.3 Strukturelle Veränderungen von langzeitkultivierten *S. pyogenes* Biofilmzellen

Mögliche strukturelle und biochemische Veränderungen in der Zellwand-Zusammensetzung von *S. pyogenes* Biofilmzellen wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Diese Versuche umfassten Messungen der Sensitivität unterschiedlich alter Biofilmzellen in Gegenwart von zwei Lysinen (Kap. 2.2.9.2). Das Mutanolysin als bekannte Muramidase hydrolysiert die  $\beta$ -1,4 glykolytische Bindung zwischen N-Acetylglucosamin und N-Acetylglucosaminsäure innerhalb der Peptidoglykanschicht. Hingegen das Phagenlysin C (PlyC) direkt die Quervernetzung der Peptidoglykanschicht Gram-positiver Bakterien aufspaltet (125, 162).

Für alle behandelten Stämme von *S. pyogenes* konnte ein Effekt der Lysine auf die Biofilmzellen gezeigt werden. Allerdings wiesen die beiden verwendeten Enzyme ein unterschiedliches Lysisverhalten der Bakterienzellen auf. Es kann angenommen werden, dass es zu einer strukturellen Veränderung der Zellwandzusammensetzung in *S. pyogenes* potentiellen VBNC-Zellen gekommen ist.

Diese Vermutung wird durch in der Literatur beschriebene Versuche mit Enterokokken und *H. pylori* bestärkt, da hier biochemische Modifikationen im Aufbau der Peptidoglykanschicht von nachgewiesenen VBNC-Zellen beschrieben werden. Diese Zellwände wiesen eine höhere Quervernetzung als die von exponentiell wachsenden Zellen auf (43, 179, 211). Dies führte zu einer erhöhten mechanischen Stabilität und Resistenz gegenüber enzymatischer Lyse. Die Arbeitsgruppe von Galdiero *et al.* (88) zeigte, dass sich bei *S. pyogenes* Kulturen über einen Zeitraum von 32 Tagen die Hydrophobizität um 20 % reduzierte, wobei der Verlust der Kultivierbarkeit bereits nach drei Tagen erfolgte und damit die Zellen in einen VBNC-ähnlichen Zustand übergingen. Vergleichbar mit einer höheren Überlebensfähigkeit dieser Zellen im Wirt können sich demnach persistierende VBNC-Zellen mit ihren strukturellen und biochemischen Modifikationen dementsprechend vor Angriffen lytischer Enzyme des Wirtes wie auch konkurrierender Bakterien schützen (208).



## 4.5 Wirksamkeit ausgewählter Antibiotika

Viele Biofilm-assoziierte chronische Infektionen können durch Antibiotika (AB) oftmals nicht erfolgreich behandelt werden, so dass es zu rezidivierenden Infektionen nach Wochen bis Jahren kommen kann. So wurde die asymptomatische Besiedlung von *S. pyogenes* aufgrund fehlgeschlagener AB-Therapien beschrieben, da die Bakterien in nicht-phagozytäre Zellen eindringen und intrazellulär als sogenannte „Persister“ oder auf Geweben in Form von Biofilmstrukturen überleben können (12, 42, 48, 208). Spoering und Lewis (214) stellen die Hypothese auf, dass die Zelldichte und stationäre Lebensform von Biofilmbakterien die Zahl an „Persister“ Zellen fördern und somit die AB-Sensitivität des Biofilms herabsetzen kann.

Bei der Testung der Antibiotikawirkung auf Biofilmzellen gelten gegenüber der Untersuchung von planktonischen Zellen andere Meßbedingungen und Zielparameter. So kann in den weitgehend stationären Zellen keine Wachstumsinhibition und nur sehr aufwendig eine Absterberate gemessen werden.

Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden sowohl bakterizid als auch bakteriostatisch wirkende Antibiotika verwendet (Kap. 2.2.9.1). Für alle getesteten Zeitpunkte der Antibiotikazugabe zum Medium und der *S. pyogenes* Stämme ergibt sich die gemeinsame Schlussfolgerung, dass gemessen an der Biofilmmasse mit Zunahme des Biofilmalters ab etwa 48 Stunden eine starke Erhöhung der AB-Resistenz auftrat (s. Abb. 39). So zeigten selbst extrem hohe AB-Konzentrationen, die für den Menschen gesundheitsschädigend sein können, keinen Effekt. Nur bei sehr jungen Biofilmstrukturen nach 16 und 24 Stunden Wachstum kam es zu einer Reduktion in der Biofilmmasse.

Auch in anderen Studien wurde gezeigt, dass das Alter der Biofilme eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von AB-Resistenzen spielt (10, 68). So wiesen zehn Tage alte *P. aeruginosa* Biofilme eine höhere Resistenz gegenüber verschiedenen Antibiotika auf als zwei Tage alte Biofilmstrukturen.

Zur Therapie von *S. pyogenes* Infektionen wird als Mittel der Wahl das Penicillin eingesetzt. Als bakterizid wirkendes AB greift es in die Zellteilung Gram-positiver Bakterien ein, indem es die Quervernetzung der Peptidoglykanschicht verhindert und damit kein Überleben der Bakterienzelle mehr möglich ist. Wichtig ist, dass Penicillin nur auf wachsende und nicht mehr auf ruhende Zellen wirken kann. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *S. pyogenes* während des Biofilmwachstums nach etwa drei Tagen in einen VBNC-ähnlichen Status wechselt. In diesem stationären Zustand zeigte sich erwartungsgemäß die Wirkungslosigkeit von Penicillin. CLSM-Aufnahmen zeigten deutlich, dass die Vitalität von

24 Stunden alten Penicillin-behandelten Biofilmen abnahm, während der zehn Tage alte Biofilm keine Vitalitätsveränderung nach der Penicillin Zugabe aufwies (s. Abb. 40). Im Vergleich zu unbehandelten Biofilmstrukturen konnte bei älteren Biofilmen nur eine Reduzierung der Schichtdicke nach Penicillin, Rifampicin und Tetrazyklin Behandlung beobachtet werden. Es würde sich hier anbieten, ein Antibiotikum zu wählen, das einen Einfluss auf nicht wachsende Zellen hat.

Die EPS-Matrix von Biofilmen wurde zudem als Diffusionsbarriere beschrieben (47, 68, 218). Demnach kann es in den oberen Schichten zu einer AB-Akkumulation kommen. Dies kann zu einem definierten Ablösen von EPS-Material führen, wodurch sich die verringerten Schichtdicken der behandelten *S. pyogenes* Biofilme erklären lassen.

Wie weit ein AB durch die Biofilmschichten penetrieren kann, hängt sowohl vom AB selbst als auch vom Biofilm ab (48, 95). Bei der Anwendung der bakteriostatisch wirkenden Antibiotika Tetrazyklin, Rifampicin sowie Clindamycin konnten folgerichtig ähnliche Effekte nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass im Biofilm die Bildung von Effluxpumpen, anderen Membranproteinen, bestimmten Stoffwechselsystemen sowie die Expression von Resistenzgenen Veränderungen in ihrer Regulation aufweisen. Diese sind speziell an die Bedürfnisse und Schutzeigenschaften des Biofilmlebens angepasst (68, 87, 256) und wurden für Pathogene wie *S. suis*, *S. pneumoniae* oder *E. faecalis* mit einer einhergehenden verstärkten AB-Resistenz beschrieben (9, 18, 89).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Therapieerfolg von Biofilm-assoziierten Infektionen maßgeblich von der Wahl des Antibiotikums abhängt. Besonders Antibiotika mit Wirkung auf nicht proliferierende Zellen sollten dabei im Vordergrund der Behandlung von Biofilm-assoziierten *S. pyogenes* Infektionen stehen. Laut unseren Ergebnissen könnte demnach Clindamycin eine valide Alternative zu Penicillin oder Makroliden darstellen. Dies korreliert auch mit den Ergebnissen einiger Fallbeobachtungen im Rahmen der Therapie rezidivierender *S. pyogenes* Infektionen (170, 171).

## 5 Zusammenfassung

Bakterielle Biofilme stellen eine besondere Lebensform dar, in denen die darin lebenden Bakterien in definierten Schichten in einer Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet sind. In der Medizin spielen Biofilm-bildende pathogene Bakterien wie *S. aureus*, *S. pneumoniae* oder *P. aeruginosa* eine bedeutende Rolle, da sie Biofilm-assoziierte Infektionen im Menschen verursachen können, die häufig chronisch-rezidivierend verlaufen und deutlich weniger gut mit Antibiotika therapierbar sind.

*Streptococcus pyogenes* (GAS) als ausschließlich humanpathogener Erreger ist gleichermaßen in der Lage, sowohl unter *in vivo* als auch *in vitro* Bedingungen Biofilmstrukturen auszubilden. Welche Faktoren und Umgebungsverhältnisse eine *S. pyogenes* Biofilmbildung z. B. im Rahmen eines Infektionsprozesses begünstigen bzw. auch inhibieren können, sind jedoch noch unzureichend untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die funktionale und morphologische Charakterisierung von *in vitro* gebildeten Biofilmstrukturen von *S. pyogenes* Stämmen der Serotypen M2, M6 und M18. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die im Batch-Kulturformat und unter statischen Bedingungen durchgeführten Biofilmtests zur Ergebnisauslesung Safraninfärbungen, fluoreszenz- sowie rasterelektronenmikroskopische Techniken und die konfokale Laserscanning Mikroskopie angewandt.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl das Kulturmedium als auch die Konzentration der verfügbaren C-Quelle das Wachstum, die Morphologie und Stabilität von *S. pyogenes* Biofilmen mit Serotyp-abhängigen Effekten beeinflussen können. Zudem konnten Hinweise darauf erhalten werden, dass *S. pyogenes* auch alternative C-Quellen als Energiequelle neben Glukose zur Biofilmbildung nutzen kann.

Weiterhin zeigte sich eine Serotyp-spezifische Hemmung der *S. pyogenes* Biofilmentwicklung in Gegenwart von künstlicher Saliva (lat. für Speichel) und Humanserum im Kulturmedium. In weiterführenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Konzentration von 10 µM Eisen im Wachstumsmedium die Biofilmbildung begünstigte, während bei höheren Konzentrationen ein stark wachstumsinhibierender Effekt nachgewiesen wurde.

Niedrige Umgebungstemperaturen von 30 °C führten generell zu einer verlangsamten Biofilmbildung, während anaerobe versus aerobe Umgebungsbedingungen wiederum Serotyp-spezifische Auswirkungen hatte.

Durch die Untersuchung der *S. pyogenes* Biofilmbildung ausgewählter Insertionsmutanten konnte die Bedeutung essentieller Virulenzfaktoren für die Biofilmbildung aufgezeigt werden. Die Dipeptidpermease, Cysteinprotease und der globale Positivregulator Mga spielen demnach eine wichtige Rolle in der initialen Mikrokoloniebildung, hingegen das M-Protein und die Kapselpolysaccharide von *S. pyogenes* nur geringfügig an der Biofilmentstehung beteiligt sind. Weiterhin ergaben die Untersuchungen, dass der globale Positivregulator RofA und die Streptokinase in der Biofilmbildung involviert sind.

Eine mögliche Beteiligung von extrazellulärer DNA (eDNA) sowohl für die initiale Biofilmbildung als auch der Biofilmzellvitalität war Serotyp-spezifisch zu beobachten. Des Weiteren wird die Biofilmstabilität u. a. durch Matrixproteine vermittelt, da durch Zugabe von Proteinase K eine Destabilisierung etablierter Biofilme beobachtet wurde. Erstmals konnten auch mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Lektine potentielle Zuckerstrukturen in der EPS und deren räumliche Beziehung zu den *S. pyogenes*-Zellen in den Biofilmen nachgewiesen werden.

In Langzeitkulturen von *S. pyogenes* Biofilmen wurde für die Gattung erstmalig eine stationäre Phase-Lebensform bei Biofilmzellen, ähnlich dem sog. „viable but non culturable“ VBNC-Status, beobachtet. Darüber hinaus konnte die Hypothese des Wechsels von der einfachen zur Gemischtsäuregärung beim *S. pyogenes* Serotyp M2-Stamm während des potentiellen VBNC-Status herausgearbeitet werden.

Die Langzeitkultivierung von *S. pyogenes* Biofilmen zeigte auch Effekte auf die Antibiotika-Empfindlichkeit sowohl der Biofilmgesamtmasse als auch der Vitalität der im Biofilm enthaltenen Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass beide Parameter vor allem in älteren Biofilmstrukturen mit höheren Resistenzen verändert waren. Dies kann im Zusammenhang mit den hier experimentell belegten strukturellen Veränderungen der Zellwandzusammensetzung von *S. pyogenes* Biofilmzellen stehen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die *S. pyogenes* Biofilmbildung und –entwicklung sowohl von abiotischen als auch genregulatorischen Faktoren beeinflusst wird. Damit ist die Basis für weitere Untersuchungen zur Entwicklung zukünftiger Therapiestrategien von *S. pyogenes* Biofilm-assoziierten Infektionen geschaffen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Ahn SJ, Wen ZT, Burne RA (2007). Effects of oxygen on virulence traits of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* **189**:8519-27.
2. Akiyama H, Morizane S, Yamasaki O, Oono T, Iwatsuki K (2003). Assessment of *Streptococcus pyogenes* microcolony formation in infected skin by confocal laser scanning microscopy. *J Dermatol Sci.* **32**:193-9.
3. Alam M, Sultana M, Nair GB, Siddique AK, Hasan NA, Sack RB, Sack DA, Ahmed KU, Sadique A, Watanabe H, Grim CJ, Huq A, Colwell RR (2007). Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in biofilms in the aquatic environment and their role in cholera transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**:17801-6.
4. Allegrucci M, Sauer K (2007). Characterization of Colony Morphology Variants Isolated from *Streptococcus pneumoniae* Biofilms. *J Bacteriol.* **189**: 2030-8.
5. Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S, Molin S, Givskov M, Tolker-Nielsen T (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol.* **59**:1114-28.
6. Allison DG (2003). The biofilm matrix. *Biofouling.* **19**:139-50.
7. Almengor AC, Kinkel TL, Day SJ, McIver KS (2007). The catabolite control protein CcpA binds to PmgA and influences expression of the virulence regulator Mga in the Group A streptococcus. *J Bacteriol.* **189**:8405-16.
8. Amerongen AV, Veerman EC (2002). Saliva: the defender of the oral cavity. *Oral Dis.* **8**:12-22.
9. Anderl JN, J Zahller, F Roe, PS Stewart (2003). Role of nutrient limitation and stationary phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 1251-6.
10. Anwar H, Strap JL, Chen K, Costerton JW (1992). Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacillin. *Antimicrob Agents Chemother.* **36**:1208-14.
11. Bagge N, Hentzer M, Andersen JB, Ciofu O, Givskov M, Høiby N (2004). Dynamics and spatial distribution of beta-lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**:1168-74.
12. Baldassarri L, Creti R, Recchia S, Imperi M, Facinelli B, Giovanetti E, Pataracchia M, Alfaroni G, Orefici G (2006). Therapeutic failures of antibiotics used to treat

- macrolide-susceptible *Streptococcus pyogenes* infections may be due to biofilm formation. *J Clin Microbiol.* **44**:2721-7.
13. Banin E, Vasil ML, Greenberg EP (2005). Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**:11076-81.
  14. Bassler BL (1999). How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol.* **2**:582-7.
  15. Beal B, Facklam R, Thompson T. (1996). Sequencing emm-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 953-958.
  16. Beckert S, Kreikemeyer B, Podbielski A (2001). Group A streptococcal rofA gene is involved in the control of several virulence genes and eukaryotic cell attachment and internalization. *Infect Immun.* **69**(1):534-7.
  17. Berge A, Björck L (1995). Streptococcal cysteine proteinase releases biologically active fragments of streptococcal surface proteins. *J Biol Chem.* **270**:9862-7.
  18. Bessen DE, Kalia A (2002). Genomic localization of a T serotype locus to a recombinatorial zone encoding extracellular matrix-binding proteins in *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* **77**: 1159-1167.
  19. Beyer-Sehlmeyer G, Kreikemeyer B, Hörster A, Podbielski A (2005). Analysis of the growth phase-associated transcriptome of *Streptococcus pyogenes*. *Int J Med Microbiol.* **295**:161-77.
  20. Bonifait L, Grignon L, Grenier D (2008). Fibrinogen induces biofilm formation by *Streptococcus suis* and enhances its antibiotic resistance. *Appl Environ Microbiol.* **74**:4969-72.
  21. Boddicker JD, Anderson RA, Jagnow J, Clegg S (2006). Signature-tagged mutagenesis of *Klebsiella pneumoniae* to identify genes that influence biofilm formation on extracellular matrix material. *Infect Immun.* **74**: 4590-7.
  22. Boles BR, Horswill AR (2008). Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog.* **4**:e1000052.
  23. Borriello G, E Werner, F Roe, AM Kim, D Ehrlich, PS Stewart (2004). Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimic. Agents Chemother.* **48**: 2659-64.
  24. Boucher RC (2004). New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J.* **23**:146-58.



25. Bradford, MM (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
26. Breese BB, Hall CB (1978). In: Beta haemolytic streptococcal diseases. Houghton Mifflin Professional Publishers Boston.
27. Brenot A, King KY, Caparon MG (2005). The PerR regulon in peroxide resistance and virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol.* **55**:221-34.
28. Brenot A, Weston BF, Caparon MG (2007). A PerR-regulated metal transporter (PmtA) is an interface between oxidative stress and metal homeostasis in *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol.* **63**:1185-96.
29. Brook I (2001). Failure of penicillin to eradicate group A beta-hemolytic streptococci tonsillitis: causes and management. *J Otolaryngol.* **30**:324-9.
30. Brown JH (1919). The use of blood agar for the study of streptococci. New York, *The Rockefeller Institute for Medical Research*, Monograph No 9:122
31. Brown MR, Williams P (1988) Resistance of bacterial biofilms: a growth related effect? *J. Antimicrob. Chemother.* **22**: 777-780.
32. Caparon MG, Geist RT, Perez-Casal J, Scott JR (1992). Environmental regulation of virulence in group A streptococci: transcription of the gene encoding M protein is stimulated by carbon dioxide. *J Bacteriol.* **174**:5693-701.
33. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A (1999). The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol.* **37**:1771-6.
34. Chaignon P, Sadovskaya I, Ragunah Ch, Ramasubbu N, Kaplan JB, Jabbouri S (2007). Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl Microbiol Biotechnol.* **75**:125-32.
35. Chaussee MS, Ajdic D, Ferretti JJ (1999). The rgg gene of *Streptococcus pyogenes* NZ131 positively influences extracellular SPEB production. *Infect Immun.* **67**:1715-22.
36. Chaussee MS, Somerville GA, Reitzer L, Musser JM (2003). Rgg coordinates virulence factor synthesis and metabolism in *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol.* **185**:6016-24.
37. Chaussee MA, Dmitriev AV, Callegari EA, Chaussee MS (2008). Growth phase-associated changes in the transcriptome and proteome of *Streptococcus pyogenes*. *Arch Microbiol.* **189**:27-41.

38. Chen L, Keramati L, Helmann JD (1995). Coordinate regulation of *Bacillus subtilis* peroxide stress genes by hydrogen peroxide and metal ions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**:8190-4.
39. Cho KH, Caparon MG (2005). Patterns of virulence gene expression differ between biofilm and tissue communities of *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* **57**: 1545–1556.
40. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, L. Baddour M, Barrett FF, Multon DM, E. H. Beachey (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*. **22**: 996-1006.
41. Cleary PP und Cue D (2000). High frequency invasion of mammalian cells by  $\beta$ -haemolytic streptococci. *Subcell. Biochem*. **33**: 137-166.
42. Conley J, Olson ME, Cook LS, Ceri H, Phan V, Davies HD (2003). Biofilm formation by group a streptococci: is there a relationship with treatment failure? *J Clin Microbiol.:* **41**:4043-8.
43. Costa K, Bacher G, Allmaier G, Dominguez-Bello MG, Engstrand L, Falk P, de Pedro MA, García-del Portillo F (1999). The morphological transition of *Helicobacter pylori* cells from spiral to coccoid is preceded by a substantial modification of the cell wall. *J Bacteriol*. **181**:3710-5.
44. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ (1978). How bacteria stick. *Sci Am*. **238**:86-95.
45. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol*. **41**:435-464.
46. Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G (1994). Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol*. **176**:2137-42.
47. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. (1995) Microbial Biofilms. *Annu. Rev. Microbiol*. **49**:711-745.
48. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. **284**:1318-22.
49. Cotter PD, Hill C (2003). Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol Mol Biol Rev*. **6**:429-53.
50. Courtney HS, Hasty DL (1991). Aggregation of group A streptococci by human saliva and effect of saliva on streptococcal adherence to host cells. *Infect Immun*. **59**:1661-6.

51. Courtney HS, Hasty DL, Li Y, Chiang HC, Thacker JL, Dale JB (1999). Serum opacity factor is a major fibronectin-binding protein and a virulence determinant of M type 2 *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol.* **32**:89-98.
52. Courtney HS, Hasty DL, Dale JB (2002). Molecular mechanisms of adhesion, colonization, and invasion of group A streptococci. *Ann. Med.* **34**: 77–87.
53. Courtney HS, Ofek I, Penfound T, Nizet V, Pence MA, Kreikemeyer B, Podbielski A, Hasty DL, Dale JB (2009). Relationship between expression of the family of M proteins and lipoteichoic acid to hydrophobicity and biofilm formation in *Streptococcus pyogenes*. *PLoS One.* **4**:e4166.
54. Cramton SE, Ulrich M, Götz F, Döring G (2001). Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* **69**:4079-85.
55. Cundell DR, Pearce BJ, Sandros J, Naughton AM, Masure HR (1995). Peptide permeases from *Streptococcus pneumoniae* affect adherence to eucaryotic cells. *Infect Immun.* **63**:2493-8.
56. Cunningham MW (2000). Pathogenesis of group A streptococcal infections. *J. Clin. Microbiol.* **13**: 470-511.
57. Cvitkovitch DG, YH LI, Ellen RP (2003). Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. *J Clin Invest.* **112**:1626-32.
58. Davey ME, O'Toole GA. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* **64**:847-67.
59. Davey ME, Duncan MJ (2006). Enhanced biofilm formation and loss of capsule synthesis: deletion of a putative glycosyltransferase in *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol.* **188**: 5510-23.
60. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* **280**:295-8.
61. de Beer D, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z (1994) Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol Bioeng.* **43**:1131-8.
62. Deighton M, Borland R (1993). Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation. *Infect Immun.* **61**:4473-9.
63. Deutscher J, Francke C, Postma PW (2006). How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* : **70**:939-1031.

- 
64. Deutscher J, Kessler U, Hengstenberg W (1985). Streptococcal phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system: purification and characterization of a phosphoprotein phosphatase which hydrolyzes the phosphoryl bond in seryl-phosphorylated histidine-containing protein. *J Bacteriol.* 1985 Sep;163(3):1203-9.
  65. Deutscher J, Saier MH Jr (1983). ATP-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation of a seryl residue in HPr, a phosphate carrier protein of the phosphotransferase system in *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **80**:6790-4.
  66. Dmitriev AV, McDowell EJ, Kappeler KV, Chaussee MA, Rieck LD, Chaussee MS (2006). The Rgg regulator of *Streptococcus pyogenes* influences utilization of nonglucose carbohydrates, prophage induction, and expression of the NAD-glycohydrolase virulence operon. *J Bacteriol.* **188**:7230-41.
  67. Doern CD, Roberts AL, Hong W, Nelson J, Lukomski S, Swords WE, Reid SD (2009). Biofilm formation by group A Streptococcus: a role for the streptococcal regulator of virulence (Srv) and streptococcal cysteine protease (SpeB). *Microbiology.* **155**:46-52.
  68. Donlan RM, Costerton W. (2002) Review: Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin. Microbiol.* **15**:167-193.
  69. Eckert R, Jeney S, Hörber JK (1997). Understanding intercellular interactions and cell adhesion: lessons from studies on protein-metal interactions. *Cell Biol Int.* **21**:707-13.
  70. Eichenbaum Z, Muller E, Morse SA, Scott JR (1996). Acquisition of iron from host proteins by the group A streptococcus. *Infect Immun.* **64**:5428-9.
  71. Eran Y, Getter Y, Baruch M, Belotserkovsky I, Padalon G, Mishalian I, Podbielski A, Kreikemeyer B, Hanski E (2007). Transcriptional regulation of the sil locus by the SilCR signalling peptide and its implications on group A streptococcus virulence. *Mol Microbiol.* **63**:1209-22.
  72. Evans SL, Arceneaux JE, Byers BR, Martin ME, Aranha H (1986). Ferrous iron transport in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* **168**:1096-9.
  73. Facklam RR (1997). Screening for streptococcal pharyngitis: current technology. *Infect. Med.* **14**: 891-898.
  74. Flemming HC (1991). Biofilme und Wassertechnologie, Teil1: Entstehung, Aufbau, Zusammensetzung und Eigenschaften von Biofilmen. In: *Wasser, Abwasser. Vol 13*:197-207.

- 
75. Flemming HC, Schaule G (1993). Mikrobielle Werkstoffzerstörung – Biofilm und Biofouling, Biofouling. In: *Materials and Corrosion/Werkstoffe und Korrosion* Vol. **45**:29-39.
  76. Flemming HC, Wingender J (2001a). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci Technol.* **43**:1-8.
  77. Flemming HC, Wingender J (2001b). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part II: Technical aspects. *Water Sci Technol.* **43**:9-16.
  78. Flemming HC (2002). Biofouling in water systems--cases, causes and countermeasures. *Appl Microbiol Biotechnol.* **59**:629-40.
  79. Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ (2007). The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol.* **189**:7945-7.
  80. Fontaine MC, Lee JJ, Kehoe MA (2003). Combined contributions of streptolysin O and streptolysin S to virulence of serotype M5 *Streptococcus pyogenes* strain Manfredo. *Infect Immun.* **71**:3857-65.
  81. Foster JS, Kolenbrander PE (2004). Development of a multispecies oral bacterial community in a saliva-conditioned flow cell. *Appl Environ Microbiol.* **70**:4340-8.
  82. Francis RT Jr, Booth JW, Becker RR (1985). Uptake of iron from hemoglobin and the haptoglobin-hemoglobin complex by hemolytic bacteria. *Int J Biochem.* **17**:767-73.
  83. Frank KL, Patel R (2007). Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by icaA/BC-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates. *Infect Immun.* **75**:4728-42.
  84. Frick IM, Morgelin M, Bjorck L (2000). Virulent aggregates of *Streptococcus pyogenes* are generated by homophilic protein-protein interactions. *Mol Microbiol.* **37**:1232-47.
  85. Frick IM, Schmidtchen A, Sjöbring U (2003). Interactions between M proteins of *Streptococcus pyogenes* and glycosaminoglycans promote bacterial adhesion to host cells. *Eur J Biochem.* **270**:2303-11.
  86. Froehlich BJ, Bates C, Scott JR (2009). *Streptococcus pyogenes* CovRS mediates growth in iron starvation and in the presence of the human cationic antimicrobial peptide LL-37. *J Bacteriol.* **191**:673-7.
  87. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* **13**:34-40.
  88. Galdiero E, Marcatili A, Donnarumma G, de Martino L, Cipollaro de L'Ero G (1993). Correlation between changes in surface hydrophobicity and interaction of *Streptococcus*

- pyogenes* with human polymorphonuclear leukocytes after prolonged starvation in sea water. *Res Microbiol.* **144**:609-16.
89. García-Castillo M, Morosini MI, Valverde A, Almaraz F, Baquero F, Cantón R, del Campo R (2007). Differences in biofilm development and antibiotic susceptibility among *Streptococcus pneumoniae* isolates from cystic fibrosis samples and blood cultures. *J Antimicrob Chemother.* **59**(2):301-4.
90. Garrigues C, Loubiere P, Lindley ND, Coccagn-Bousquet M (1997). Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio. *J Bacteriol.* **179**:5282-7.
91. Garvie EI (1980). Bacterial lactate dehydrogenases. *Microbiol Rev.* **44**:106-39.
92. Giard JC, Hartke A, Flahaut S, Boutibonnes P, Auffray Y (1997). Glucose starvation response in *Enterococcus faecalis* JH2-2: survival and protein analysis. *Res Microbiol.* **148**:27-35.
93. Gibson CM, Caparon MG (1996). Insertional inactivation of *Streptococcus pyogenes* sod suggests that prtF is regulated in response to a superoxide signal. *J Bacteriol.* **178**:4688-95.
94. Gibson CM, Mallett TC, Claiborne A, Caparon MG (2000). Contribution of NADH oxidase to aerobic metabolism of *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol.* **182**:448-55.
95. Gilbert P, Das J, Foley I (1997). Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res.* **11**:160-7.
96. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* **2**:95-108.
97. Hall-Stoodley L, Nistico L, Sambanthamoorthy K, Dice B, Nguyen D, Mershon WJ, Johnson C, Hu FZ, Stoodley P, Ehrlich GD, Post JC (2008). Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *BMC Microbiol.* **8**:173.
98. Hanski E, Horwitz PA, Caparon MG (1992). Expression of protein F, the fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes* JRS4, in heterologous streptococcal and enterococcal strains promotes their adherence to respiratory epithelial cells. *Infect Immun.* **60**:5119-25.
99. Heim S, Lleo MM, Bonato B, Guzman CA, Canepari P (2002). The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. *J Bacteriol.* **184**:6739-45.



100. Hidalgo-Grass C, Ravins M, Dan-Goor M, Jaffe J, Moses AE, Hanski E (2002). A locus of group A *Streptococcus* involved in invasive disease and DNA transfer. *Mol Microbiol.* **46**:87-99.
101. Hillmann F, Riebe O, Fischer RJ, Mot A, Caranto JD, Kurtz DM Jr, Bahl H (2009). Reductive dioxygen scavenging by flavo-diiron proteins of *Clostridium acetobutylicum*. *FEBS Lett.* **583**:241-5.
102. Hirota K, Murakami K, Nemoto K, Ono T, Matsuo T, Kumon H, Miyake Y (1998) . Fosfomycin reduces CD15s-related antigen expression of *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* **42**:1083-7.
103. Holbein BE (1980). Iron-controlled infection with *Neisseria meningitidis* in mice. *Infect Immun.* **29**:886-91.
104. Hols P, Ramos A, Hugenholtz J, Delcour J, de Vos WM, Santos H, Kleerebezem M (1999). Acetate utilization in *Lactococcus lactis* deficient in lactate dehydrogenase: a rescue pathway for maintaining redox balance. *J Bacteriol.* **181**:5521-6.
105. Hondorp ER, McIver KS (2007). The Mga virulence regulon: infection where the grass is greener. *Mol Microbiol.* **66**:1056-65.
106. Houot L, Watnick PI (2008). A novel role for enzyme I of the *Vibrio cholerae* phosphoenolpyruvate phosphotransferase system in regulation of growth in a biofilm. *J Bacteriol.* **190**:311-20.
107. Hoyle BD, Costerton JW (1991). Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog Drug Res.* **37**:91-105.
108. Hytönen J, Haataja S, Gerlach D, Podbielski A, Finne J (2001). The SpeB virulence factor of *Streptococcus pyogenes*, a multifunctional secreted and cell surface molecule with streptadhesin, laminin-binding and cysteine protease activity. *Mol Microbiol.* **39**:512-9.
109. Ingham CJ, Beerthuyzen M, van Hylckama Vlieg J (2008). Population heterogeneity of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 microcolonies in response to and recovery from acid stress. *Appl Environ Microbiol.* **74**:7750-8.
110. Iyer R, Baliga NS, Camilli A (2005). Catabolite control protein A (CcpA) contributes to virulence and regulation of sugar metabolism in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* **187**:8340-9.
111. Jaffe J, Natanson-Yaron S, Caparon MG, Hanski E (1996). Protein F2, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus pyogenes*, possesses two binding domains. *Mol Microbiol.* **21**:373-84.

- 
112. Jäger S, Mack D, Rohde H, Horstkotte MA, Knobloch JK (2005). Disintegration of *Staphylococcus epidermidis* biofilms under glucose-limiting conditions depends on the activity of the alternative sigma factor sigmaB. *Appl Environ Microbiol.* **71**:5577-81.
  113. Johnson M, Cockayne A, Williams PH, Morrissey JA (2005). Iron-responsive regulation of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* involves fur-dependent and fur-independent mechanisms. *J Bacteriol.* **187**:8211-5.
  114. Johnson DR, Kaplan EL, VanGheem A, Facklam RR, Beall B (2006). Characterization of group A streptococci (*Streptococcus pyogenes*): correlation of M-protein and emm-gene type with T-protein agglutination pattern and serum opacity factor. *J Med Microbiol.* **55**:157-64.
  115. Joseph LA, Wright AC (2004). Expression of *Vibrio vulnificus* capsular polysaccharide inhibits biofilm formation. *J Bacteriol.* **186**(3): 889-93.
  116. Kinkel TL, McIver KS (2008). CcpA-mediated repression of streptolysin S expression and virulence in the group A streptococcus. *Infect Immun.* **76**:3451-63.
  117. King KY, Horenstein JA, Caparon MG (2000). Aerotolerance and peroxide resistance in peroxidase and PerR mutants of *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol.* **182**:5290-9.
  118. Kizy AE, Neely MN (2009). First *Streptococcus pyogenes* signature-tagged mutagenesis screen identifies novel virulence determinants. *Infect Immun.* **77**:1854-65.
  119. Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aas-Jørgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T (2003a). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol. Microbiol.* **48**: 1511-24.
  120. Klausen M, Aas-Jørgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T. (2003b). Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol. Microbiol.* **50**: 61-8.
  121. Kleerebezem M, Quadri LE, Kuipers OP, de Vos WM (1997). Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol.* **24**:895-904.
  122. Kolenbrander PE, London J (1993). Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol.* **175**:3247-52.
  123. Kolenbrander PE, Ganeshkumar N, Cassels FJ, Hughes CV (1993). Coaggregation: specific adherence among human oral plaque bacteria. *FASEB J.* **7**:406-13.
  124. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, Palmer RJ Jr (2002). Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* **66**:486-505.

125. Köller T, Nelson D, Nakata M, Kreutzer M, Fischetti VA, Glocker MO, Podbielski A, Kreikemeyer B (2008). PlyC, a novel bacteriophage lysin for compartment-dependent proteomics of group A streptococci. *Proteomics*. 8: 140-8.
126. Kreikemeyer B, Martin DR, Chhatwal GS (1999). SfbII protein, a fibronectin binding surface protein of group A streptococci, is a serum opacity factor with high serotype-specific apolipoproteinase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **178**: 305-311.
127. Kreikemeyer B, McIver KS, Podbielski A (2003). Virulence Factor regulation and regulatory networks in *Streptococcus pyogenes* and their impact on pathogen-host interactions. *Trends Microbiol.* **11**: 224-232.
128. Kreikemeyer B, Oehmcke S, Nakata M, Hoffrogge R, Podbielski A (2004a). *Streptococcus pyogenes* Fibronectin-binding Protein F2. *J. Biol. Chem.* **279**: 15850-15859.
129. Kreikemeyer B, Klenk M, Podbielski A (2004). The intracellular status of *Streptococcus pyogenes*: role of extracellular matrix-binding proteins and their regulation. *J. Med. Microbiol.* **294**: 177-188.
130. Kreikemeyer B, Nakata M, Oehmcke S, Gschwendtner C, Normann J, Podbielski A (2005). *Streptococcus pyogenes* Collagen Type I-binding Cpa Surface Protein. *J. Biol. Chem.* **280**: 33228-33239.
131. Landry RM, An D, Hupp JT, Singh PK, Parsek MR (2006). Mucin-*Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance. *Mol Microbiol.* **59**:142-51.
132. Lancefield RC (1928). The antigenic complex of *Streptococcus haemolyticus*. I. Demonstration of a type-specific substance in extracts of *Streptococcus haemolyticus*. *J. Exp. Med.* **47**: 91-103.
133. Lancefield RC (1933). A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* **57**: 571-595.
134. Lancefield RC (1962). Current knowledge of the type specific M antigens of group A streptococci. *J. Immunol.* **89**: 307-313.
135. Lähteenmäki K, Edelman S, Korhonen TK (2005). Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion. *Trends Microbiol.* **13**:79-85.
136. Lembke C, Podbielski A, Hidalgo-Grass C, Jonas L, Hanski E, Kreikemeyer B (2005). Characterization of biofilm formation by clinically relevant serotypes of group A streptococci. *Appl Environ Microbiol* 72: 2864-75.

- 
137. Lengeler JW, Jahreis K (2009). Bacterial PEP-dependent carbohydrate: phosphotransferase systems couple sensing and global control mechanisms. *Contrib Microbiol.* **16**:65-87. Review.
138. Lewis K (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**:999-1007.
139. Lewis K (2005). Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc).* **70**:267-74. Review.
140. Li YH, Lau PC, Lee JH, Ellen RP, Cvitkovitch DG (2001). Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *J Bacteriol.* **183**:897-908.
141. Lizano S, Luo F, Bessen DE (2007). Role of streptococcal T antigens in superficial skin infection. *J Bacteriol.* **189**:1426-34.
142. Lleò MM, Pierobon S, Tafi MC, Signoretto C, Canepari P (2000). mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. *Appl Environ Microbiol.* **66**:4564-7.
143. Lleò MM, Bonato B, Tafi MC, Signoretto C, Boaretti M, Canepari P (2001). Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. *J Appl Microbiol.* **91**:1095-102.
144. Lleo M, Bonato B, Tafi MC, Caburlotto G, Benedetti D, Canepari P (2007). Adhesion to medical device materials and biofilm formation capability of some species of enterococci in different physiological states. *FEMS Microbiol Lett.* **274**:232-7.
145. Loridan C, Alouf JE (1986). Purification of RNA-core induced Streptolysin S, and isolation and haemolytic characteristics of the carrier-free toxin. *J. Gen. Microbiol.* **132**:307-315.
146. Luo F, Lizano S, Banik S, Zhang H, Bessen DE (2008). Role of Mga in group A streptococcal infection at the skin epithelium. *Microb Pathog.* **45**:217-24.
147. Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K, Wozniak DJ (2009). Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog.* **5**:e1000354.
148. Mack D, Siemssen N, Laufs R (1992). Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect Immun.* **60**:2048-57.
149. Manetti AG, Zingaretti C, Falugi F, Capo S, Bombaci M, Bagnoli F, Gambellini G, Bensi G, Mora M, Edwards AM, Musser JM, Graviss EA, Telford JL, Grandi G,

- Margarit I (2007). *Streptococcus pyogenes* pili promote pharyngeal cell adhesion and biofilm formation. *Mol Microbiol.* **64**:968-83.
150. Mann EE, Rice KC, Boles BR, Endres JL, Ranjit D, Chandramohan L, Tsang LH, Smeltzer MS, Horswill AR, Bayles KW (2009). Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One.* **4**:e5822.
151. Marsh PD, Bradshaw DJ (1995). Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol.* **15**:169-75.
152. Marsh PD (2003). Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub- and supragingival environment. *Oral Dis.* **9**:16-22.
153. McCord JM, Fridovich I (1996). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* **244**:6049-55.
154. McIver KS, Heath AS, Green BD, Scott JR (1995). Specific binding of the activator Mga to promoter sequences of the *emm* and *scpA* genes in the group A streptococcus. *J. Bacteriol.* **177**: 6619–6624.
155. Mohamed JA, Huang DB (2007). Biofilm formation by enterococci. *J Med Microbiol.* **56**:1581-8.
156. Molinari G und Chhatwal GS (1999). Streptococcal invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 56-61.
157. Montañez GE, Neely MN, Eichenbaum Z (2005). The streptococcal iron uptake (Siu) transporter is required for iron uptake and virulence in a zebrafish infection model. *Microbiology.* **151**:3749-57.
158. Mora M, Bensi G, Capo S, Falugi F, Zingaretti C, Manetti AG, Maggi T, Taddei AR, Grandi G, Telford JL (2005). Group A Streptococcus produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**:15641-6.
159. Moscoso M, García E, López R (2006). Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *J Bacteriol.* **188**:7785-95.
160. Musser JM, DeLeo FR (2004). Toward a genome-wide systems biology analysis of host-pathogen interactions in group A Streptococcus. *Am J Pathol.* **167**:1461-72.
161. Nakata M, Köller T, Moritz K, Ribardo D, Jonas L, McIver KS, Sumitomo T, Terao Y, Kawabata S, Podbielski A, Kreikemeyer B (2008). Mode of expression and functional characterization of FCT-3 pilus region-encoded proteins in *Streptococcus pyogenes* serotype M49. *Infect Immun.* **77**:32-44.

162. Nelson D, Schuch R, Chahales P, Zhu S, Fischetti VA (2006). PlyC: a multimeric bacteriophage lysin. *Proc Natl Acad Sci U S A*: **103**:10765-70.
163. Neu TR, Lawrence JR (1999). Lectin-binding analysis in biofilm systems. *Methods Enzymol.* **310**:145-52.
164. Neu T, Swerhone GD, Lawrence JR (2001). Assessment of lectin-binding analysis for *in situ* detection of glycoconjugates in biofilm systems. *Microbiology.* **147**: 299-313.
165. Neves AR, Ramos A, Shearman C, Gasson MJ, Almeida JS, Santos H (2000). Metabolic characterization of *Lactococcus lactis* deficient in lactate dehydrogenase using in vivo <sup>13</sup>C-NMR. *Eur J Biochem.* **267**:3859-68.
166. Nyström T (2001). Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death. *Arch Microbiol.* **176**:159-64.
167. Nyström T (2003). Nonculturable bacteria: programmed survival forms or cells at death's door? *Bioessays* **25**:204-11.
168. Oehmcke S, Podbielski A, Kreikemeyer B (2004). Function of the fibronectin binding serum opacity factor of *Streptococcus pyogenes* in adherence to epithelial cells. *Infect Immun.* **72**:4302-8.
169. O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Humphreys H, Robinson DA, Loughman A, Foster TJ, O'Gara JP (2008). A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *J Bacteriol.* **190**:3835-50.
170. Orrling A, Stjernquist-Desatnik A, Schalén C, Kamme C (1994). Clindamycin in persisting streptococcal pharyngotonsillitis after penicillin treatment. *Scand J Infect Dis.***26**:535-41.
171. Orrling A, Stjernquist-Desatnik A, Schalén C, Kamme C (1996). Treatment failure in streptococcal pharyngotonsillitis. An attempt to identify penicillin tolerant *Streptococcus pyogenes*. *Scand J Infect Dis.* **28**:143-7.
172. Österlund A, Engstrand L (1997). An Intracellular Sanctuary for *Streptococcus pyogenes* in Human Tonsillar Epithelium-Studies of Asymptomatic Carriers and In Vitro Cultured Biopsies. *Acta Otolaryngol* **117**:883-888.
173. Pajkos A, Vickery K, Cossart Y (2004). Is biofilm accumulation on endoscope tubing a contributor to the failure of cleaning and decontamination? *J Hosp Infect.* **58**:224-9.
174. Parkinson JS, Kofoed EC (1992). Communication modules in bacterial signalling proteins. *Annu. Rev. Genet.* **26**: 71-112.
175. Patti JM, Hook M (1994). Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. *Curr Opin Cell Biol.* **6**:752-8.



176. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M (1994). MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol.* **48**:585-617.
177. Payne SM, Finkelstein RA (1978). The critical role of iron in host-bacterial interactions. *J Clin Invest.* **61**:1428-40.
178. Petersen FC, Tao L, Scheie AA (2005). DNA binding-uptake system: a link between cell-to-cell communication and biofilm formation. *J Bacteriol.* **187**:4392-400.
179. Pfeffer JM, Strating H, Weadge JT, Clarke AJ (2006). Peptidoglycan O acetylation and autolysin profile of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *J Bacteriol.* **188**:902-8.
180. Pichichero ME, Hoeger W, Marsocci SM, Murphy AM, Francis AB, Dragalin V (1999). Variables influencing penicillin treatment outcome in streptococcal tonsillopharyngitis. *Arch Pediatr Adolesc Med.* **153**:565-70.
181. Pillai SK, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr, Murray BE, Inouye RT (2004). Effects of glucose on fsr-mediated biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. *J Infect Dis* **190**:967-70.
182. Pine L, Reeves MW (1978). Regulation of the synthesis of M protein by sugars, Todd Hewitt broth, and horse serum, in growing cells of *Streptococcus pyogenes*. *Microbios.* **21**:185-212.
183. Podbielski A, Melzer B, Lütticken R (1991). Application of the polymerase chain reaction to study the M protein(-like) gene family in beta-hemolytic streptococci. *Medical Microbiology and Immunology* **180**:213-227.
184. Podbielski A, Melzer B, Lütticken R (1992). PCR mediated amplification of M protein (*emm*) genes of group A streptococci. *Zentralblatt für Bakteriologie Suppl.* **22**: 353-354.
185. Podbielski A, Pohl B, Woischnik M, Körner C, Schmidt KH, Rozdzinski E, Leonard BA (1996). Molecular characterization of group A streptococcal (GAS) oligopeptide permease (*opp*) and its effect on cysteine protease production. *Mol Microbiol.* **21**:1087-99.
186. Podbielski A, Leonard BAB (1998). The group A streptococcal dipeptide permease (Dpp) is involved in uptake of essential amino acids and affects expression of cysteine protease. *Mol. Microbiol.* **28**: 1323-1334.
187. Podbielski A, Woischnik M, Leonard BAB and Schmidt KH (1999). Characterization of *nra*, a global negative regulator gene in group A streptococci. *Mol. Microbiol.* **31**:1051-1064.
188. Podbielski A, Kreikemeyer B (2001). Persistence of group A streptococci in eukaryotic cells--a safe place? *Lancet.* **358**(9275):3-4.

189. Podbielski A und Kreikemeyer B (2004). Cell-density-dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. *Int.J.Infect.Dis.* **6**: 81-95.
190. Qin Z, Ou Y, Yang L, Zhu Y, Tolker-Nielsen T, Molin S, Qu D (2007). Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*. **153**(Pt 7):2083-92.
191. Reizer J, Novotny MJ, Hengstenberg W, Saier MH Jr (1984). Properties of ATP-dependent protein kinase from *Streptococcus pyogenes* that phosphorylates a seryl residue in HPr, a phosphocarrier protein of the phosphotransferase system. *J Bacteriol.* **160**:333-40.
192. Ribardo DA, McIver KS (2006). Defining the Mga regulon: comparative transcriptome analysis reveals both direct and indirect regulation by Mga in the group A streptococcus. *Mol. Microbiol.* **62**. 491-508.
193. Rice SA, McDougald D, Kjelleberg S (2000). *Vibrio vulnificus*: a physiological and genetic approach to the viable but nonculturable response. *J InfectChemother.* **6**:115-20.
194. Reading NC, Sperandio V (2006). Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* **254**:1-11.
195. Ricci S, Janulczyk R, Björck L (2002). The regulator PerR is involved in oxidative stress response and iron homeostasis and is necessary for full virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun.* **70**:4968-76.
196. Rosch J, Caparon M (2004). A microdomain for protein secretion in Gram-positive bacteria. *Science.* **304**:1513-5.
197. Ryan PA, Pancholi V, Fischetti VA (2001). Group A Streptococci Bind to Mucin and Human Pharyngeal Cells through Sialic Acid-Containing Receptors. *Infect Immun* **69**:7402-7412.
198. Salim KY, de Azavedo JC, Bast DJ, Cvitkovitch DG (2007). Role for sagA and siaA in quorum sensing and iron regulation in *Streptococcus pyogenes*. *InfectImmun.***75**:5011-7.
199. Saravani GA und Martin DR (1990a). Characterization of opacity factor from group A streptococci. *J. Med. Microbiol.* **33**: 55-60.
200. Saravani, G. A. und D. R. Martin. 1990b. Opacity factor from group A streptococci is an apoproteinase. *FEMS Microbiol. Lett.* **68**: 35-40.
201. Sauer K, AK Camper, GD Ehrlich, JW Costerton, DG Davies (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bac.* **184**: 1140-54.

- 
202. Schmidt KH, Günther E, Courtney HS (1996). Expression of both M protein and hyaluronic acid capsule by group A streptococcal strains results in a high virulence for chicken embryos. *Med Microbiol Immunol.* **184**:169-73.
203. Schooling SR, Beveridge TJ (2006). Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J Bacteriol.* **188**:5945-57.
204. Schooling SR, Hubley A, Beveridge TJ (2009). Interactions of DNA with biofilm-derived membrane vesicles. *J Bacteriol.* **191**:4097-102.
205. Seidl K, Goerke C, Wolz C, Mack D, Berger-Bächi B, Bischoff M (2008). *Staphylococcus aureus* CcpA affects biofilm formation. *Infect Immun.* **76**:2044-50.
206. Seki M, Iida K, Saito M, Nakayama H, Yoshida S (2004). Hydrogen peroxide production in *Streptococcus pyogenes*: involvement of lactate oxidase and coupling with aerobic utilization of lactate. *J Bacteriol.* **186**:2046-51.
207. Sela S, Aviv A, Tovi A, Burstein I, Caparon MG, Hanski E (1993). Protein F: an adhesin of *Streptococcus pyogenes* binds fibronectin via two distinct domains. *Mol Microbiol.* **10**:1049-55.
208. Sela S, Neeman R, Keller N, Barzilai A (2000). Relationship between asymptomatic carriage of *Streptococcus pyogenes* and the ability of the strains to adhere to and be internalised by cultured epithelial cells. *J Med Microbiol.* **49**:499-502.
209. Shelburne SA 3rd, Okorafor N, Sitkiewicz I, Sumby P, Keith D, Patel P, Austin C, Graviss EA, Musser JM (2007). Regulation of polysaccharide utilization contributes to the persistence of group a streptococcus in the oropharynx. *Infect Immun.* **75**:2981-90.
210. Shelburne SA 3rd, Keith D, Horstmann N, Sumby P, Davenport MT, Graviss EA, Brennan RG, Musser JM (2008). A direct link between carbohydrate utilization and virulence in the major human pathogen group A Streptococcus. *Proc Natl Acad Sci U S A* : **105**:1698-703.
211. Signoretto C, Lleo` MM, Tafi MC, Canepari P (2000). Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1953-9.
212. Sitkiewicz I, Musser JM (2006). Expression microarray and mouse virulence analysis of four conserved two-component gene regulatory systems in group a streptococcus. *Infect Immun.* **74**:1339-51.
213. Smoot LM, Smoot JC, Graham MR, Somerville GA, Sturdevant DE, Migliaccio CA, Sylva GL, Musser JM (2001). Global differential gene expression in response to growth temperature alteration in group A Streptococcus. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**:10416-21.

- 
214. Spoering AL, Lewis K (2001). Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J. Bacteriol.* **183**:6746-51.
215. Stanley NR, Britton RA, Grossman AD, Lazazzera BA (2003). Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays. *J Bacteriol.*: **185**:1951-7.
216. Stanley NR, Lazazzera BA (2004). Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol Microbiol.*: **52**:917-24.
217. Steinberger RE, Holden PA (2005) Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Appl Environ Microbiol.* **71**:5404-10.
218. Stewart PS (1996). Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 2517-22.
219. Stoodley P, Debeer D, Lewandowski Z (1994). Liquid Flow in Biofilm Systems. *Appl Environ Microbiol.* **60**:2711-2716.
220. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* **56**:187-209.
221. Stoodley P, Wilson S, Hall-Stoodley L, Boyle JD, Lappin-Scott HM, Costerton JW (2001). Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Appl Environ Microbiol.* **67**:5608-13.
222. Suntharalingam P, Cvitkovitch DG (2005). Quorum sensing in streptococcal biofilm formation. *Trends Microbiol.* **13**:3-6.
223. Sutherland IW (2001). Exopolysaccharides in biofilms, flocs and related structures. *Water Sci Technol.* **43**:77-86.
224. Sutrina SL, McGeary T, Bourne CA (2007). The phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and biofilms in gram-positive bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **12**:269-72. Review.
225. Svensson MD, Scaramuzzino DA, Sjöbring U, Olsén A, Frank C, Bessen DE (2000). Role for a secreted cysteine proteinase in the establishment of host tissue tropism by group A streptococci. *Mol Microbiol.* **38**:242-53.
226. Tabak LA (1990). Structure and function of human salivary mucins. *Crit Rev Oral Biol Med.* **1**:229-34.
227. Tabak LA, Levine MJ, Mandel ID, Ellison SA (1982). Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *J Oral Pathol.* **11**:1-17.

- 
228. Takemura N, Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Noguchi N, Ebisu S (2004). Single species biofilm-forming ability of root canal isolates on gutta-percha points. *Eur J Oral Sci.* **112**:523-9.
229. Talay SR, Ehrenfeld E, Chhatwal GS, Timmis KN (1991). Expression of the fibronectin-binding components of *Streptococcus pyogenes* in *Escherichia coli* demonstrates that they are proteins. *Mol Microbiol.* **5**:1727-34.
230. Talay SR, Valentin-Weigand P, Jerlstrom PG, Timmis KN, Chhatwal GS (1992). Fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*: sequence of the binding domain involved in adherence of streptococci to epithelial cells. *Infect Immun.* **60**:3837-44.
231. Titgemeyer F, Hillen W (2002). Global control of sugar metabolism: a gram-positive solution. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **82**:59-71.
232. Top FH und Wannamaker LW (1968). The serum opacity reaction of *Streptococcus pyogenes*: frequency of production of streptococcal lipoproteinase by strains of different serological types and the relationship to M protein production. *J. Hyg.* **66**: 49-58.
233. Trainor VC, Udy RK, Bremer PJ, Cook GM (1999). Survival of *Streptococcus pyogenes* under stress and starvation. *FEMS Microbiol Lett.* **176**:421-8.
234. van de Rijen I, Kessler RE (1980). Growth characteristics of group A streptococci in a new chemically defined medium. *Infect Immun* **27**:444-448.
235. van Schaik EJ, Giltner CL, Audette GF, Keizer DW, Bautista DL, Slupsky CM, Sykes BD, Irvin RT (2005). DNA binding: a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili. *J Bacteriol.* **187**: 1455-64.
236. Van Wamel WJ, Hendrickx AP, Bonten MJ, Top J, Posthuma G, Willems RJ (2007). Growth condition-dependent Esp expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation. *Infect Immun.* **75**:924-31.
237. Vickery K, Pajkos A, Cossart Y (2004). Removal of biofilm from endoscopes: evaluation of detergent efficiency. *Am J Infect Control.* **32**:170-6.
238. Vroom JM, KJ Grauw, GK Watson, JJ Birmingham, C Allison (1999). Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two-photon excitation microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3502-11.
239. Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, Yao Y, Fischer ER, DeLeo FR, Otto M (2004). A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem.* **279**:54881-6.
240. Walters MC, F Roe, A Bugnicourt, MJ Franklin, PS Stewart (2003). Contribution of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of

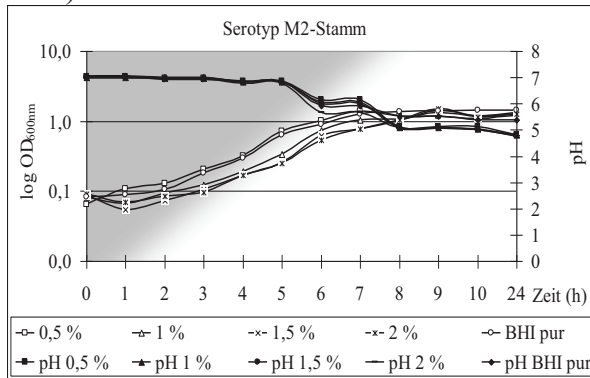
- Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 317-23.
241. Wang B, Cue D, Cleary P (2006). Intracellular invasion by *Streptococcus pyogenes*: invasins, host receptors, and relevance to human disease. In Gram-positive pathogens. Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI(eds). Washington, DC: *ASM Press*, 29-36.
242. Wang CH, Lin CY, Luo YH, Tsai PJ, Lin YS, Lin MT, Chuang WJ, Liu CC, Wu JJ (2005). Effects of oligopeptide permease in group A streptococcal infection. *Infect Immun.* **73**:2881-90.
243. Watnick P, Kolter R (2000). Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol.* **182**:2675-9.
244. Watson SP, Clements MO, Foster SJ (1998). Characterization of the starvation-survival response of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* **180**:1750-8.
245. Weinberg ED (1978). Iron and infection. *Microbiol Rev.* **42**:45-66.
246. Wessels MR, Bronze MS (1994). Critical role of the group A streptococcal capsule in pharyngeal colonization and infection in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91**(25):12238-42.
247. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**: 1487.
248. Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE (1996). Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu Rev Microbiol.* **50**:513-52.
249. Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U. (2000). Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev.* **24**:661-71.
250. Wood DN, Chaussee MA, Chaussee MS, Buttaro BA (2005). Persistence of *Streptococcus pyogenes* in stationary-phase cultures. *J Bacteriol.* **187**:3319-28.
251. Wood DN, Weinstein KE, Podbielski A, Kreikemeyer B, Gaughan JP, Valentine S, Buttaro BA (2009). Generation of Metabolically Diverse Strains of *Streptococcus pyogenes* during Survival in Stationary Phase. *J Bacteriol.* Epub ahead of print.
252. Xu KD, PS Stewart, F Xia, CT Huang, GC McFeters (1998). Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4035-39.
253. Xu KD, MJ Franklin, CH Park, GA McFeters, PS Stewart (2001). Gene expression and protein levels of the stationary phase sigma factor, RpoS, in continuously-fed *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* **199**: 67-71.



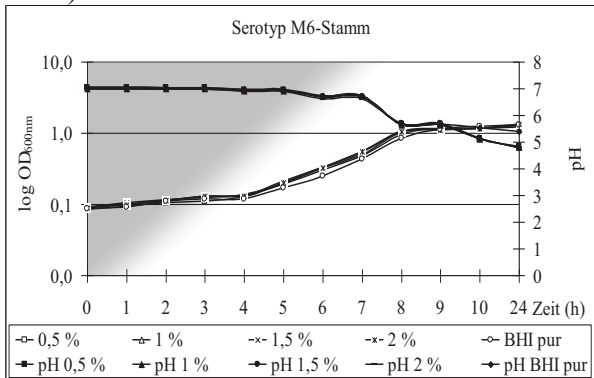
- 254. Yang L, Barken KB, Skindersoe ME, Christensen AB, Givskov M, Tolker-Nielsen T (2007). Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. **153**(Pt 5):1318-28.
- 255. Yang Y, Sreenivasan PK, Subramanyam R, Cummins D (2006). Multiparameter assessments to determine the effects of sugars and antimicrobials on a polymicrobial oral biofilm. *Appl Environ Microbiol*. **72**:6734-42.
- 256. Zhang L, Mah TF (2008). Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. *J Bacteriol*. **190**:4447-52.

## 7 Anhang

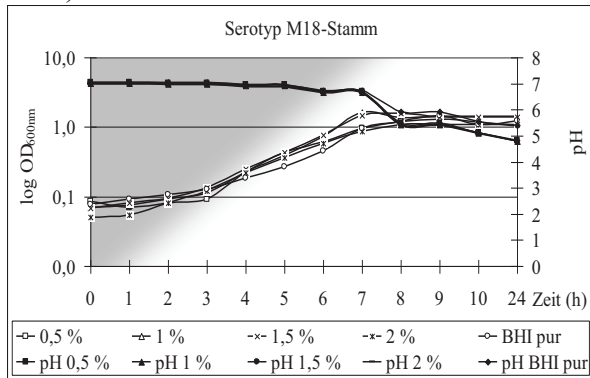
A-1)



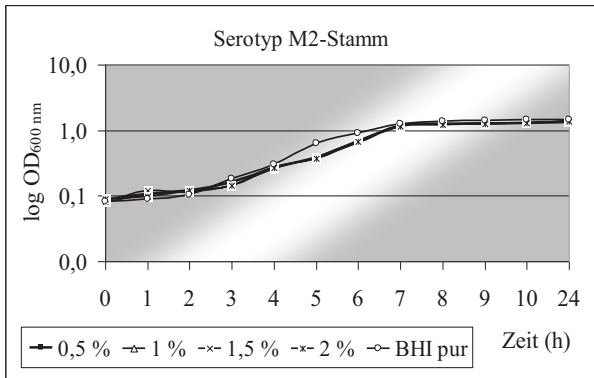
A-2)



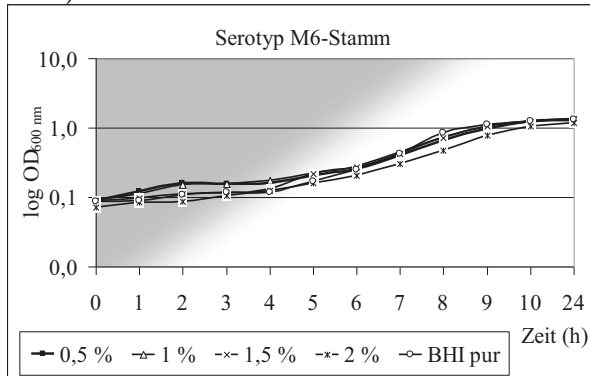
A-3)



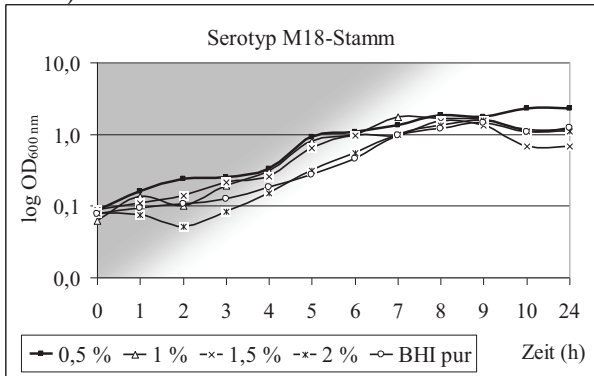
B-1)



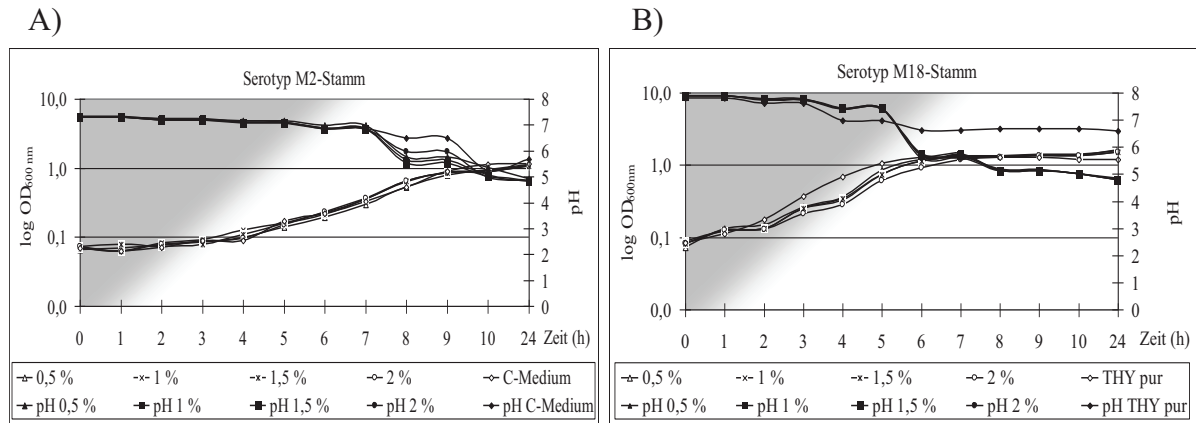
B-2)



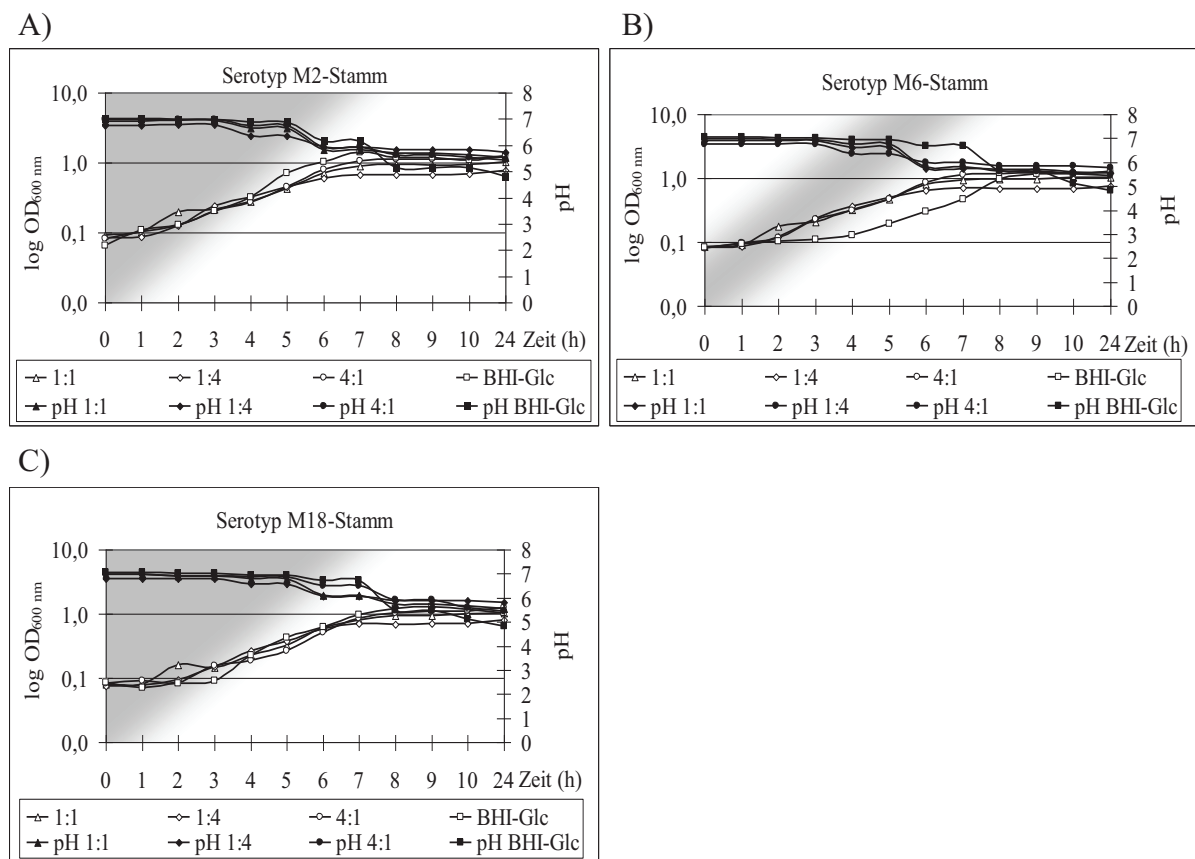
B-3)



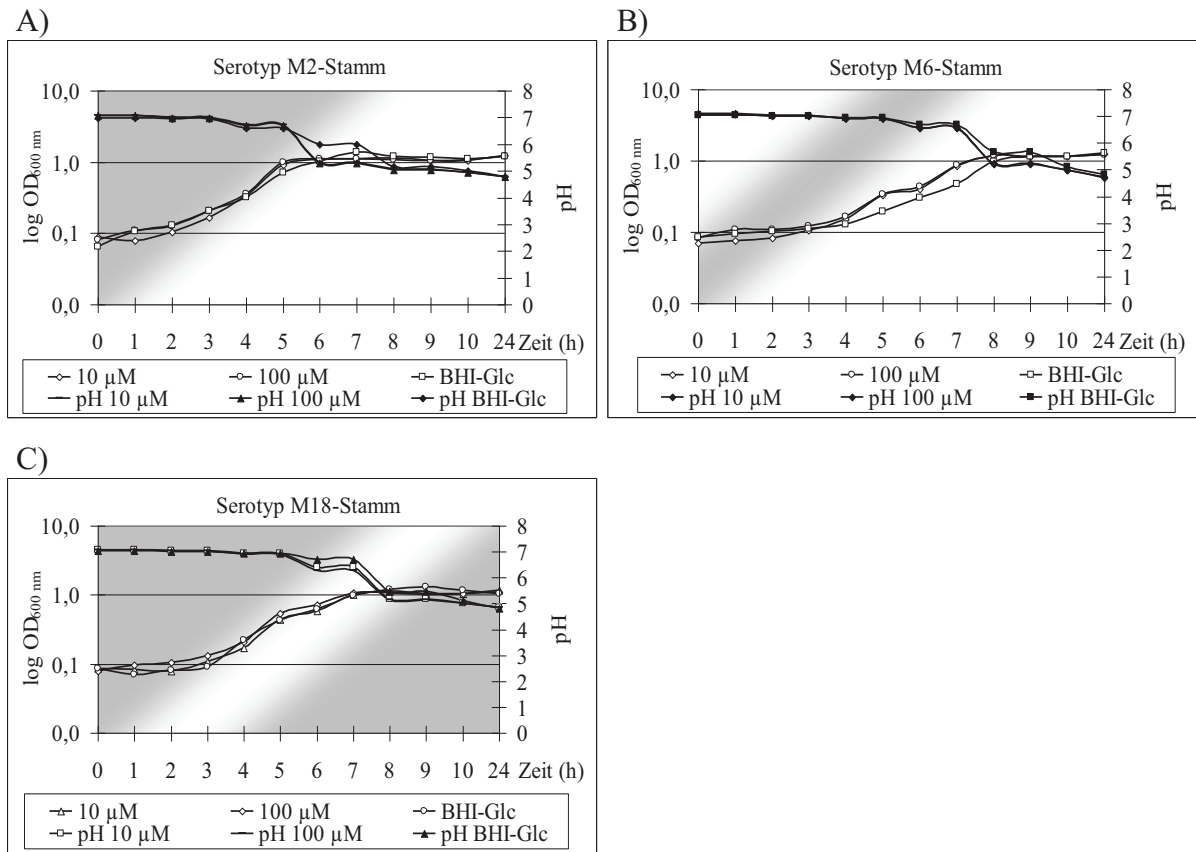
**Abb. A1:** Einfluss von verschiedenen C-Quellen auf das Wachstumsverhalten von planktonischen *S. pyogenes* Zellen. Dargestellt sind die Daten der gemessenen  $OD_{600nm}$ . Zusätzlich wurden die pH-Werte der BHI Kulturen (A-1 bis A-3) ermittelt und graphisch miteingebunden. Exemplarisch gezeigt sind die Wachstumskinetiken der Stämme der Serotypen M2, M6 und M18 in BHI mit Glukose (A-1 bis A-3) sowie der Serotyp M2-Stamm in BHI + Fruktose (B-1), M6-Stamm in BHI + Saccharose (B-2) sowie M18-Stamm in BHI + Mannose (B-3). Die Prozentzahlen in den Legenden der einzelnen Abbildungen bezeichnen die Menge des dem jeweiligen Ansatz eingesetzten Zuckers.



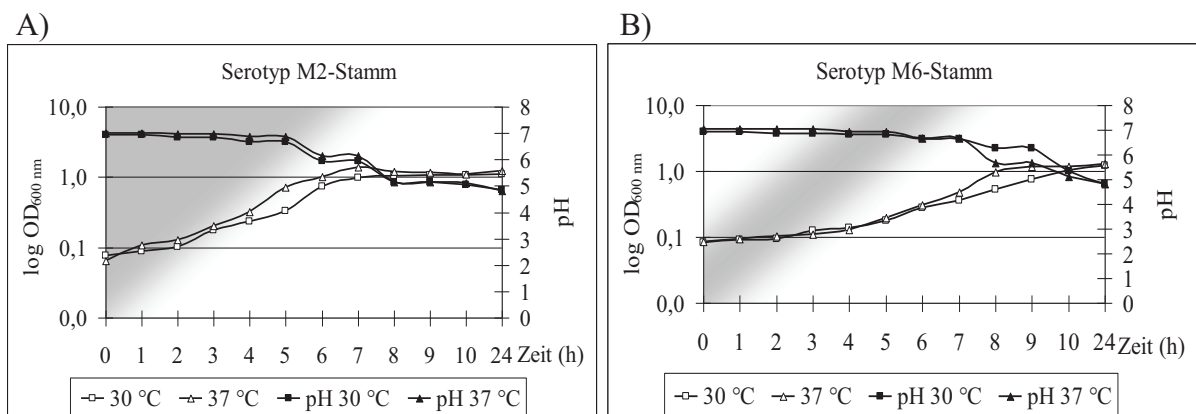
**Abb. A2:** Einfluss des C- und THY Mediums auf das Wachstumsverhalten von *S. pyogenes* Stämmen der Serotypen M2 in C-Medium (A) und M18 in THY Medium (B). Es sind die Daten der gemessenen OD<sub>600nm</sub> sowie die pH-Werte graphisch dargestellt. Die Prozentzahlen in den Legenden der einzelnen Abbildungen bezeichnen die Menge des dem jeweiligen Ansatz eingesetzten Zuckers.

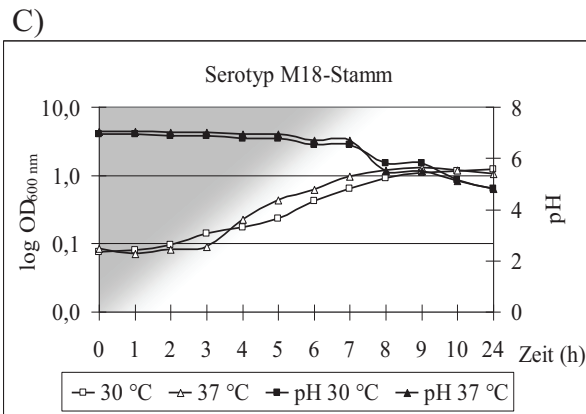


**Abb. A3:** Einfluss von Saliva auf das Wachstumsverhalten von *S. pyogenes* Stämmen der Serotypen M2 (A), M6 (B) und M18 (C) in BHI + 0,5 % Glukose. Es sind die Daten der gemessenen OD<sub>600nm</sub> sowie die pH-Werte graphisch dargestellt. Die angegebenen Verhältnisse in den Abbildungslegenden geben das Mischungsverhältnis von BHI/Glc mit der künstlichen Saliva-Lösung an.

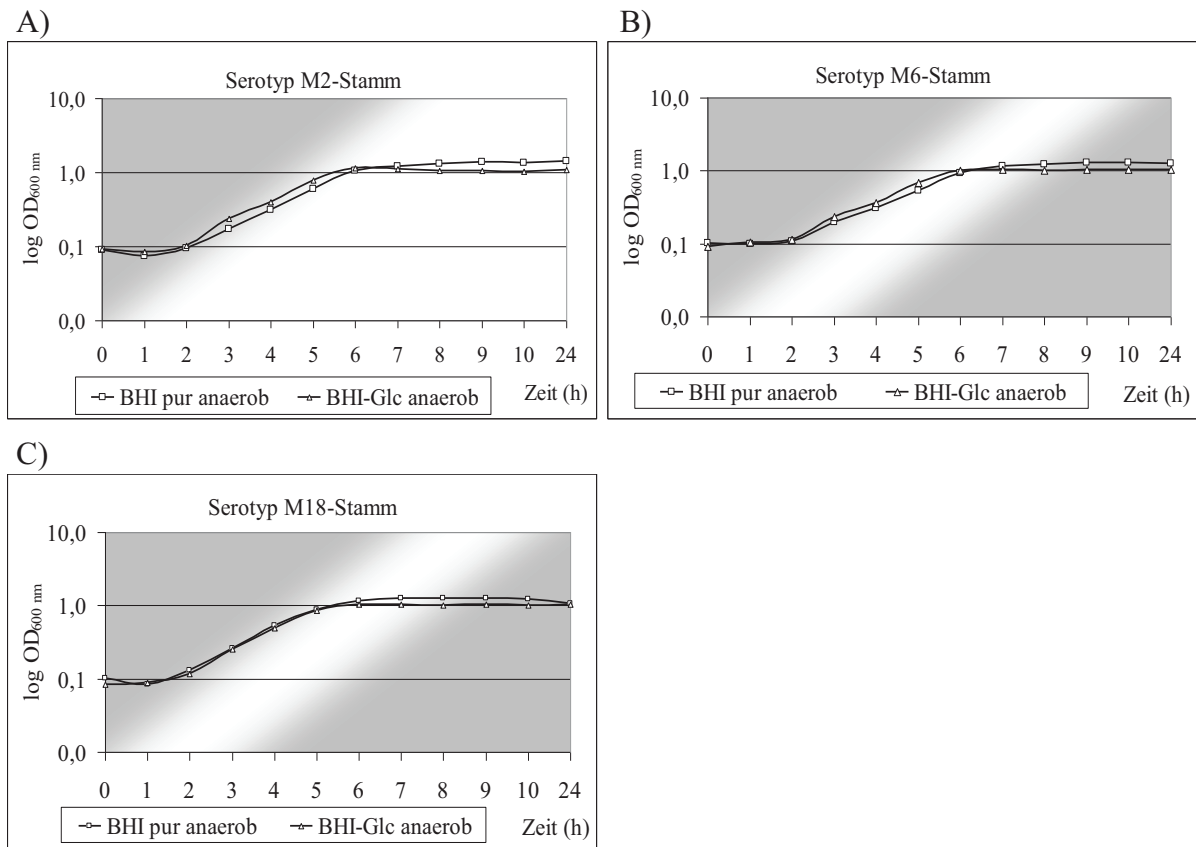


**Abb. A4:** Einfluss von Eisenionen auf das Wachstumsverhalten von *S. pyogenes* Stämmen der Serotypen M2 (A), M6 (B) und M18 (C) in BHI Medium mit Eisen(III)chlorid (in  $\mu\text{M}$  Endkonzentration). Es sind die Daten der gemessenen  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  sowie die pH-Werte graphisch dargestellt.

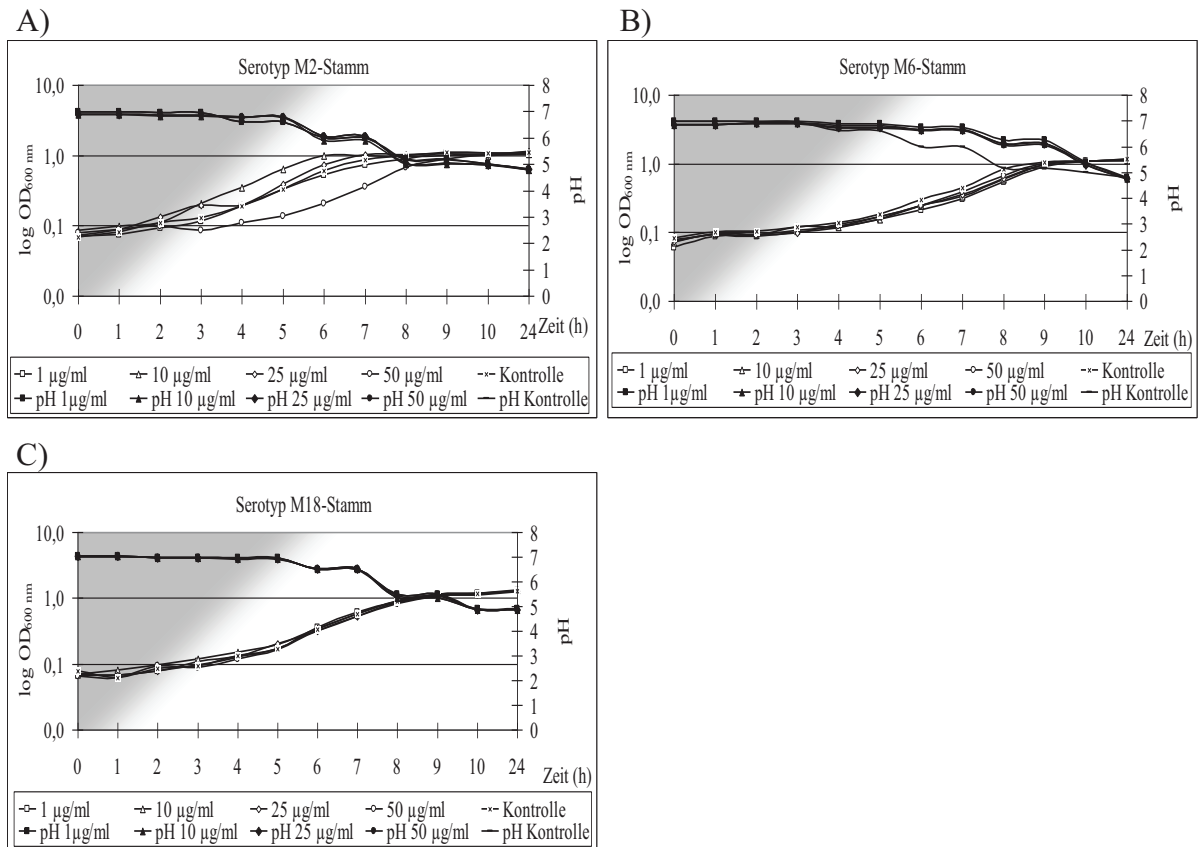




**Abb. A5:** Wachstumskinetiken von *S. pyogenes* Serotypen der Stämme M2 (A), M6 (B) und M18 (C). Die Kulturen wurden in BHI Medium + 0,5 % Glukose bei 30 °C und 37 °C inkubiert. Es sind die Daten der gemessenen OD<sub>600nm</sub> sowie die pH-Werte graphisch dargestellt.



**Abb. A6:** Wachstumskinetiken von *S. pyogenes* Stämmen der Serotypen M2 (A), M6 (B) und M18 (C). Die Kulturen wurden in BHI Medium pur und mit 0,5 % Glukose unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Es sind die Daten der gemessenen OD<sub>600nm</sub> graphisch dargestellt.



**Abb. A7:** Wachstumskinetiken von Proteinase K-behandelten planktonischen *S. pyogenes* Zellen in BHI mit 0,5 % Glukose. Dargestellt sind die Ergebnisse der Stämme der Serotypen M2 (A), M6 (B) und M18 (C). Als Kontrollen wurden die Kulturmedien mit dem jeweiligen Proteinase K-Puffer inkubiert. Parallel zur OD<sub>600nm</sub> Messung erfolgte die pH-Wert Bestimmung des Kulturmedium.



## Danksagung

Herrn **Prof. Dr. Dr. Andreas Podbielski** danke ich für das Überlassen des interessanten Themas sowie der kompetenten Betreuung während meiner Doktorarbeit. Mein besonderer Dank gilt Herrn **PD Dr. Bernd Kreikemeyer** für die stetige Unterstützung und Betreuung meiner Doktorarbeit. Ich danke ihm für die sehr interessanten Diskussionen und Motivationsgespräche, die mit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich bedanke mich bei Herrn **Prof. Dr. Hubert Bahl** vom Institut für Biowissenschaften/ Mikrobiologie für die Übernahme des Gutachtens.

Herrn **Prof. Dr. Ludwig Jonas** sowie Herrn **Wolfgang Labs** und Herrn **Gerhard Fulda** vom Elektronenmikroskopischen Zentrum (EMZ) des Instituts für Pathologie danke ich für die gute Unterstützung während der vielen Probenpräparationen sowie der tollen Zusammenarbeit zur Erstellung der Bilddokumente.

Herrn **Dr. Peter Lorenz** von der Arbeitsgruppe Molekulare Zellbiologie danke ich für die Möglichkeit, die Biofilme mittels der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie zu untersuchen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei **Jana Normann, Yvonne Humboldt, Kathleen Arndt** und **Lars Middelborg** für die große Hilfe bei den experimentellen Arbeiten und der tollen Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Ein besonderer Dank gilt **Dr. Tomas Fiedler**, der durch seine stetige Hilfsbereitschaft in fachlichen Fragestellungen sowie für das Korrekturlesen dieser Dissertation mir eine sehr große Hilfe war. Auch ein großes Dankeschön an alle weiteren Laborkollegen der AG Kreikemeyer, insbesondere **Nikolai Siemens, Sylvio Redanz, Kerstin Standar, Thomas Köller, Regina Arlt, Venelina Sugareva, Catur Riani** und **Tobias Eggert** danke ich für die angenehme Zusammenarbeit, die gegenseitige Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit im Labor.

Abschließend möchte ich mich natürlich ganz herzlichst bei meinen Eltern und meinem Bruder für die stetige Motivation und der liebevollen Unterstützung während dieser Zeit bedanken.

Ein großes Dankeschön gilt meinem Freund Mathias. Danke, dass du immer für mich da bist und mich stets in allen Lebenslagen unterstützt.

## Publikationsverzeichnis

### Publikationen

Riani C, Standar K, Srimuang S, Lembke C, Kreikemeyer B, Podbielski A: Transcriptome analyses extend understanding of *Streptococcus pyogenes* regulatory mechanisms and behaviour toward immunomodulatory substances. *Int J Med Microbiol* **2007**; 297:513-23.

Lembke C, Podbielski A, Hidalgo-Grass C, Jonas L, Hanski E, Kreikemeyer B: Characterization of biofilm formation by clinically relevant serotypes of group A streptococci. *Appl Environ Microbiol* **2006**; 72(4):2864-75.

### Vorträge

Lembke C, Kreikemeyer B, Podbielski A: Nutritional factors and structural components determining *Streptococcus pyogenes* biofilm formation and development, 59. Jahrestagung der DGHM in Göttingen, **2007**.

Lembke C, Kreikemeyer B, Podbielski A: Contribution of carbohydrates in streptococcal biofilm formation“, 2<sup>nd</sup> Baltic Meeting on Microbial Carbohydrates in Rostock, **2006**.

Lembke C, Kreikemeyer B, Podbielski A: Identification and characterization of Biofilm formation phenotypes of several clinically *Streptococcus pyogenes* serotype strains“, Biofilms II Tagung in Leipzig, **2006**.

**Poster**

Lembke C, Podbielski A, Kreikemeyer B: *Streptococcus pyogenes* biofilm phenotypes and biofilm transcriptome, Biofilms III Tagung in München, **2008**.

Kreikemeyer B, Lembke C, Riani C, Köller T, Podbielski A: Structures and components of *Streptococcus pyogenes* biofilms, 4<sup>th</sup> ASM Conference on Biofilms Quebec City, Kanada, **2007**.

Lembke C, Podbielski A, Kreikemeyer B: Characterization of biofilm formation by clinically relevant serotypes of Group A Streptococci, Jahrestagung VAAM/ DGHM in Göttingen, **2005**.